UNTERSUCHUNGEN ZUM MECHANISMUS DER ANTIMYKOTISCHEN WIRKUNG VON MICONAZOL®

Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Rainold ARNDT
aus Berlin

1978

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544719_0012

UNTERSUCHUNGEN ZUM MECHANISMUS DER ANTIMYKOTISCHEN WIRKUNG VON MICONAZOL®

Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Rainold ARNDT
aus Berlin

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent: Priv.Doz. Dr. Uwe Reichert

2. Referent: Prof. Dr. E.-R.Lochmann

Tag der letzten Prüfung: 13.6.1978

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1	Mykosen - eine neuzeitliche Infektionskrankheit	1
1.2	Miconazol - ein neues Antimykotikum	5
2.	AUFGABENSTELLUNG	10
3.	MATERIAL UND METHODEN	12
3.1	Material	12
3.1.1	Bezugsquellen und Charakteristik der verwendeten Chemikalien	12
3.1.2	Geräte	13
3.1.3	Medien	14
3.1.4	Stämme	14
3.1.5	Puffer	14
3.2	Methoden	15
3.2.1	Anzucht der Hefezellen	15
3.2.2	Koloniebildungsfähigkeit der Zellen in Gegenwart von Miconazol	15
3.2.3	Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen in Gegenwart von Miconazol	15
3.2.4	Die Wirkung von Miconazol auf den Atmungs- und Gärungsstoffwechsel der Zelle	16
3.2.5	Aufnahme verschiedener Metaboliten in Gegenwart von Miconazol	17
3.2.5.1	Glucose-Präinkubation stationärer Zellen	17
3.2.5.2	Aufnahmekapazität von Hefezellen für verschiedene Metaboliten in Gegenwart von Miconazol	17
3.2.5.3	Spezifische Wechselwirkung von Miconazol mit dem Purintransportsystem	18

Seite

3.2.6	Miconazol als membranotropes Agenz	18
3.2.6.1	Herstellung von Hefesphaeroplasten	18
3.2.6.2	Isolierung der Plasmamembran	19
3.2.6.3	Bestimmung der Effluxgeschwindigkeiten für Purinbasen in Gegenwart von Miconazol	19
3.2.6.4	Der Einfluß von Miconazol auf die Protonenpermeabilität der Zelle	20
3.2.6.5	Aktivitätsbestimmung der membrangebundenen ATPase	20
3.2.6.6	Isolierung eines Hefelipidextraktes	21
3.2.6.7	Untersuchungen an künstlichen Lipidmembranen	22
4.	ERGEBNISSE	27
4.1	Hemmung des Zellwachstums durch Miconazol	27
4.1.1	Koloniebildungsfähigkeit der Zellen in Gegenwart von Miconazol	27
4.1.2	Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen in Gegenwart von Miconazol	27
4.2	Aufnahme von Miconazol durch die Zellen	31
4.2.1	Aufnahmekapazität der Zellen für Miconazol	31
4.2.2	Initiale Aufnahmegeschwindigkeit der Zellen für Miconazol	31
4.2.3	Initiale Aufnahmegeschwindigkeit der Zellen für Miconazol in Abhängigkeit von der Zelldichte	34
4.2.4	Initiale Aufnahmegeschwindigkeit der Zellen für Miconazol in Abhängigkeit vom pH-Wert des Inkubationspuffers	34
4.2.5	Auswaschbarkeit von Miconazol	34
4.3	Der Einfluß von Miconazol auf den Energiestoffwechsel der Zellen	38
4.3.1	Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen in äthanolhaltigem Kulturmedium	38
4.3.2	Der Einfluß von Miconazol auf den Atmungs- und Gärungsstoffwechsel	40

		Seite
4.4	Wirkung von Miconazol auf Transport und Akkumulation von Metaboliten	44
4.4.1	Einfluß von Miconazol auf die Aufnahmekapazität von Glucose	44
4.4.2	Einfluß von Miconazol auf die Aminosäure-Aufnahme	46
4.4.3	Einfluß von Miconazol auf die Purinaufnahme	46
4.4.4	Gibt es spezifische Wechselwirkungen von Miconazol mit dem Purintransportsystem ?	51
4.4.5	Der Einfluß von Miconazol auf die Metabolisierung von Purinen	54
4.5	Miconazol als membranotropes Agenz	56
4.5.1	Der Einfluß von Miconazol auf die Stabilität von Hefesphaeroplasten	56
4.5.2	Durch Miconazol bedingter Efflux von Hypoxanthin	62
4.5.3	Der Einfluß von Miconazol auf die Ionenpermeabilität der Zelle	62
4.5.4	Die Wirkung von Miconazol auf die Aktivität der Plasmamembran-ATPase	67
4.5.5	Die Wirkung von Miconazol auf künstliche Lipidmembranen	70
4.5.5.1	Einfluß von Miconazol auf die elektrische Leitfähigkeit von Membranen aus oxidiertem Cholesterol	71
4.5.5.2	Einfluß von Miconazol auf die Leitfähigkeit von Membranen aus einem Hefelipidextrakt	73
4.6	Verminderung der Miconazol-Wirkung durch Kationen	77
4.6.1	Einfluß von Miconazol auf das Zellwachstum in verschiedenen Medien	77
4.6.2	Einfluß mono-, di- und trivalenter Kationen auf die Aufnahme von Miconazol	81
4.6.3	Einfluß divalenter Kationen auf den Miconazol-bedingten Efflux von Hypoxanthin	81
4.6.4	Abhängigkeit des "Kationen-Effekts" von der Zeit der Kationen-Zugabe	84
4.6.5	Der Einfluß von mono-, di- und trivalenten Kationen auf die durch Miconazol verursachte Ionenpermeabilität der Zelle	84

Seite

4.6.6	Komplexbildung von Miconazol mit Aluminium	87
4.7	Versuche zur Induktion und Selektion von Miconazol-resistenten Mutanten	89
4.7.1	Induktion und Selektion von Mutanten	90
4.7.2	Charakterisierung der Mutanten	90
5.	DISKUSSION	91
5.1	Aufnahme von Miconazol in die Zelle	91
5.2	Einfluß von Miconazol auf das Wachstum und auf den Stoffwechsel der Zellen	93
5.3	Miconazol als membranotropes Agenz	98
5.4	Verminderung der Miconazol-Wirkung durch Kationen	101
6.	HYPOTHESE ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS VON MICONAZOL	103
7.	ZUSAMMENFASSUNG	106
8.	LITERATUR	109

Danksagung

Lebenslauf

Abkürzungen

E	Extinktion
HTS	Hefetrockensubstanz
GCP	Glucose-Citrat-Puffer
ATP	Adenosin-5′-triphosphat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
K_m	Transportkonstante, Michaeliskonstante Substratkonzentration bei halbmaximaler Aufnahmegeschwindigkeit
V	maximale Aufnahmegeschwindigkeit für Substrate bei Substratsättigung
t_T	Phasenumwandlungstemperatur (thermal phasetranstion)

Miconazol-Nitrat^R wurde der Einfachheit halber als Miconazol bezeichnet.

1. EINLEITUNG

1.1 Mykosen - eine neuzeitliche Infektionskrankheit

Charles Nicolle[1] schrieb 1934 in seinem " Destin des Maladies Infectieuses" : " Wie alle an Lebewesen gebundenen Phänomene sind auch Infektionskrankheiten heute nicht, was sie gestern waren". Diese Aussage fand in neuerer Zeit Unterstützung u.a. durch Dubos [1958][2] und Burnet [1962][3].

Infektionskrankheiten treten dann auf, wenn kleine körperfremde Krankheitserreger (Mikroorganismen) in die Gewebe oder Säfte eines pflanzlichen oder tierischen Organismus (Makroorganismus) eindringen, sich dort vermehren und zu Symptomen führen. Im biologischen Sinne sind Infektionskrankheiten lediglich als eine Wechselwirkung zwischen zwei der Variabilität und den Umwelteinflüssen unterworfenen Organismen zu bezeichnen.
Ein Individuum ohne Umwelt ist nicht denkbar. Die Umwelt übt einen gestaltenden Einfluß auf die Individuen aus, wobei jedes Individuum, auch bei räumlichen Überschneidungen, seine eigene Umwelt hat. Die Beziehungen des Individuums zu seiner Umwelt ist nicht etwa durch seine Haut begrenzt, sondern alles, womit es in Beziehung tritt, gehört zu ihm. Zur Umwelt des Makroorganismus gehören somit auch die Mikroorganismen. Der Mensch beherbergt Mikroorganismen auf Schleimhäuten der nach außen geöffneten Körperhöhlen (Mund, Darm, Scheide etc.). Im Sinne der Umweltlehre gehören diese Mikroorganismen zum Menschen, da sie ein nicht wegzudenkender Bestandteil seiner Umwelt sind.

Jeder Makroorganismus beherbergt seine ihm individuell angepaßte Bakterienflora. Jedes Individuum hat so seine eigene Umwelt, die es jedoch erst neu schaffen muß. Als Beispiel dafür gelten die Krankheiten, die jedes Kind durchmachen muß, um sich an die Umwelt zu gewöhnen.

Kinder erkranken deshalb auch viel häufiger als der an seine Umwelt bereits besser angepaßte Erwachsene.

Die Umwelt des Individuums ändert sich im Laufe der Ontogenese. Zusätzlich greifen übergeordnet die Regeln der Phylogenese ein. Daraus ergibt sich, daß in einem gemeinsamen Lebensraum nicht nur täglich eine gegenseitige Beeinflussung der Organismen stattfindet, sondern überindividuell schon über Jahrtausende stattgefunden hat. Durch ihr Reaktionsvermögen haben sich die auf engstem Raum zusammenlebenden Individuen auf Anpassung eingestellt. In der Entwicklung gegenseitiger Anpassungen befinden wir uns auch heute noch.

In Bezug auf Makro- und Mikroorganismen sind Vorgänge gegenseitiger Anpassung nach Doerr [1941][4] als ein Gast-Wirt-Verhältnis zu bezeichnen. Dieses Verhältnis kann sehr vielgestaltig sein. Der Gast kann sehr bescheiden sein, aber auch sehr anspruchsvoll, so daß der Gast nicht einmal mehr über ein selbständiges Leben verfügen muß.

Die normale Besiedlung von Mikroorganismen in gewissen Teilen des menschlichen Körpers wie z.B. in Mundhöhle, Darm und Scheide bezeichnet man als physiologische Mund-, Darm- und Scheidenflora. So leben auch Hefepilze beim gesunden Menschen als Saprophyten auf der Haut und den Schleimhäuten. Erst bei Personen mit geschwächter Abwehrkraft kann die Pilzbesiedlung zu schweren Infektionskrankheiten (Mykosen) führen.

Mykosen traten bis etwa 1950 in Europa während und nach den beiden Weltkriegen nur als Hautbefall auf. Ursache dafür waren der Mangel an ärztlicher Fürsorge, an Reinigungsmitteln und an Waschräumen. Nach dem zweiten Weltkrieg mehrten sich aber auch die Beobachtungen von Mykosen der Schleimhäute und der inneren Organe. Diese Beobachtungen stammten jedoch aus den Ländern, deren Bevölkerung selbst vom Krieg verschont geblieben waren (USA, Schweiz). Diese Verbreitung der Mykosen hat nach Vandaele und Uttendaele[5] u.a. folgende Gründe:

1] Dermatomykosen werden heute von den Ärzten leichter erkannt, da sie über das Erscheinungsbild der Erkrankung besser informiert sind. Zusätzlich suchen Patienten williger ärztliche Hilfe auf.

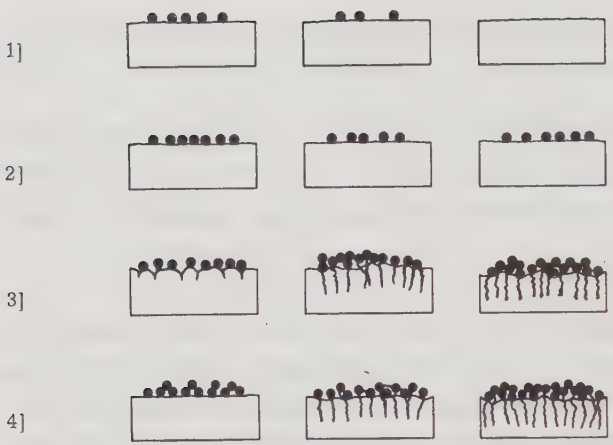
2] Seit der Einführung einiger therapeutischer Agentien wie Antibiotika, Cytostatika und Kontraceptiva, hat das Auftreten von Candida-Erkrankungen zugenommen.

3] Kleiderstoffe aus synthetischen Fasern fördern die Entwicklung eines günstigen Milieus für die Verbreitung der Pilze.

4] Wachsendes Interesse an Schwimmbädern und fabrikeigenen Duschen führt zu einem vermehrten Kontakt mit den einheimischen Pilzen.

5] Der Kontakt mit exotischen pathogenen Pilzen wächst durch vermehrte Reisetätigkeit.

Über die Gewebeinvasion weiß man heutzutage noch sehr wenig. Eine starke Zellvermehrung des jeweiligen fakultativ-pathogenen Pilzes auf der Schleimhaut ist die Voraussetzung des Wechsels von der saprophytären in die parasitäre Phase des Pilzes. Zur Erklärung des Phasenwechsels wird in Abb. 1 exemplarisch das Verhalten von Candida albicans auf einer Schleimhaut beschrieben.
Im Mittelpunkt der Pilzerkrankungen steht heute hinsichtlich seiner Pathogenität und Häufigkeit beim Menschen der Pilz Candida albicans. Der Sproßpilz kommt besonders häufig in der Scheide der Frau vor. Berichten zufolge lassen sich im Scheidenabstrich gesunder Frauen in 9 bis 15 % der Fälle Soorpilze nachweisen, bei schwangeren Frauen sogar 34 %[7,8].
Mit der Entdeckung des Griseofulvins [1958] ist es möglich geworden, diese Pilzkrankheiten gezielt zu behandeln. Heute stehen weitere Antimykotika wie die Antibiotika Amphotericin B, Nystatin und Pimaricin sowie Chemotherapeutika wie Clorimazol, 5-Fluorocytosin und Miconazol zur Verfügung. Trotzdem bereitet die Bekämpfung der Vaginal-Candidasis noch Schwierigkeiten. So bemerkt Professor R. Hurley[9] in ihrem Referat " Trends in candidal Vaginitis" 1976:
" It is astonishing that a disease so easily recognized, so prevalent and so distressing should have evoked such scant comment in medical writings and that it should still prove sometimes intractable to treatment ".



aus Gemeinhardt, R., "Endomykosen des Menschen" [6]

Abb. 1:

1.] Saprophytäre Besiedlung ist nur vorübergehend. Durch Selbstreinigung der Schleimhaut Eliminierung des Sproßpilzes.

2.] Es liegt eine geringe Besiedlung mit saprophytärem Charakter vor. Es besteht ein Gleichgewichtszustand zwischen Makro- und Mikroorganismus. Befund liegt im Bereich des Physiologischen. Candida ist Bestandteil der normalen Schleimhautflora.

3.] Infektion einer geschädigten Schleimhaut mit anschließender Erkrankung und Nekrose.

4.] Es liegt eine endogene Infektion einer ungeschädigten Schleimhaut vor. Lokaler Befall aufgrund Verschlechterung der allgemeinen Abwehrlage und/oder Verschiebung des biologischen Gleichgewichts durch Antibiotikatherapie.

Der Grund für die Schwierigkeiten in der Therapie ist nach Polemann [1970][10] auf einer chemotherapeutischen Unterentwicklung bei den intern anwendbaren Antimykotika zurückzuführen. Die Entwicklung neuer geeigneter Antimykotika ist jedoch auch abhängig von der Untersuchung der biochemischen Wirkungsweise der zur Verfügung stehenden Chemotherapeutika.

1.2 Miconazol - ein neues Antimykotikum

Miconazol[R] ist ein chemisches Antimykotikum, das in den Laboratorien der Janssen Pharmazeutika (Belgien) synthetisiert wurde[11]:
Aus der Synthese einer großen Anzahl von ß-substituierten 1-Phenetylimidazolen zeigten die 1(ß-Benzylphenethyl)imidazole eine Breitspektrum-Aktivität gegen Mykosen, Hefen und gram-positive Bakterien[12,13,14,15,16].
Sowohl im in vitro als auch im klinischen Test erwies sich 1-[2,4-dicloro-ß-(2,4-dichlorobenzyloxy)phenetyl]-imidazol-nitrat (R 14 889), Miconazol[R] (Abb. 2) genannt, als sehr erfolgreich.

Gute in vitro-Hemmwirkungen konnten für Dermatophyten (Trichophyton-Arten, Microsporum-Arten und Epidermophyton floccosum) und fakultativ-pathogene Sproßpilze (Candida-Arten, Cryptococcus neoformans, Trichosporon cutaneum) nachgewiesen werden[13,17,18].
Miconazol[R] zeigte vergleichbare antimykotische Wirkung wie Tolnaftat gegen Dermatophyten und wie Nystatin gegen Candida-Arten. Weiterhin erwies sich Miconazol als erfolgreich gegen Sporothrix schenckii Aspergillus-Arten, Mucor-Arten, Rhizopus-Arten, Absidia-Arten, Histoplasma capsulatum, Blastomyces dermatitidis, Blastomyces brasiliensis, Norcardia-Arten und Streptomyces-Arten[13]. Auch gram-positive Bakterien waren gegen Miconazol empfindlich. Hier zeigte sich Miconazol ähnlich aktiv wie Natriumbenzylpenicillin[14]. Gegen gram-negative Bakterien erwies sich Miconazol allerdings als erfolglos[13,17,19].

Miconazol Nitrat

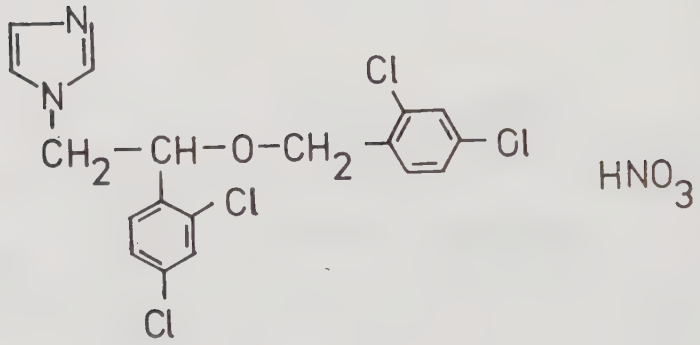


Abb. 2:

1-{2-(2,4-dichlorophenyl)-2-[(2,4-dichlorophenyl)methoxy]ethyl}-1H-imidazol mononitrat .

Im klinischen Bereich sind die Vorteile von Miconazol groß, da die bisher im Handel befindlichen Antimykotika meist nur eine enge Spezifität für eine definierte Gruppe von Pilzen haben. Auch im Anwendungsbereich ist Miconazol anderen Pharmaka überlegen. Miconazol wird inzwischen äußerlich, oral und intravenös verabreicht[20]. Bei Therapieversuchen am Menschen traten bisher weder wesentliche Nebenwirkungen auf, noch sind Kontraindikationen bekannt[20].

Miconazol wurde bisher beim Menschen u.a. bei folgenden Mycosen eingesetzt:

Haut und Nagelinfektionen[5, 14, 15, 21-32]
Speiseröhren-/Luftröhreninfektionen[33, 34]
Lungeninfektion[35, 36]
Vaginainfektion[37-51]
Leukämie[52]
Hirnhautinfektion[53]
Verdauungstraktinfektion[54]

Im Gegensatz zu den recht zahlreichen Berichten über die Therapie von Mykosen mit Miconazol ist über den molekularen Wirkungsmechanismus des Antimykotikums recht wenig bekannt:
Untersuchungen von Swamy et al.[18] zeigten in Gegenwart von 20 - 100 μM Miconazol eine Permeabilitätsänderung der Zellen von Candida albicans. Der Efflux an Na^+- und K^+-Ionen wurde erhöht. Weiterhin war ein Verlust an Nucleotiden, Aminosäuren und Proteinen festzustellen.
Die fungizide Wirkung von Miconazol erwies sich in synthetischem Medium stärker als in Sabouraud-Medium. Dieser Effekt wurde von Swamy et al.[18] auf die Gegenwart divalenter Kationen wie Ca^{++} und Mg^{++} im synthetischen Medium zurückgeführt. Untersuchungen zum Efflux von 260 nm absorbierenden Materialien in Gegenwart von Miconazol zeigten eine Verminderung der Fungizid-Wirkung in Gegenwart divalenter Kationen.
Van den Bossche[55] konnte für C. albicans zeigen, daß Miconazol sich während der exponentiellen Wachstumsphase an das Plasmalemma und an die Zellwand bindet, während es in der stationären Phase an die Mikrosomenfraktion bindet. Auch die Hemmung der Cytochrom b-5 Reduktase und die Gegenwart von Miconazol im 100 000 x g Sediment weisen auf eine Wechselwirkung von Miconazol mit mikrosomalen Membranen hin.

Weitere Ergebnisse von van den Bossche[55] zeigen, daß die Aufnahme von Purinen in C. albicans-Zellen in Gegenwart einer das Wachstum der Zellen noch nicht beeinträchtigenden Konzentration (0,01 µM) inhibiert wird. Die Aufnahme von Glucose, Glycin und Leucin wurde dagegen nicht durch Miconazol beeinflußt.

Die durch Miconazol bedingten Änderungen von Permeabilitäts- und Transporteigenschaften in Candida albicans-Zellen sind nach Swamy et al.[18] und van den Bossche[55] auf eine strukturelle Änderung der Zellmembran zurückzuführen. Diese Vermutung konnte von de Nollin und Borgers[57] durch elektronenmikroskopische Bilder erhärtet werden. Eine Volumenzunahme der Zellen und erste morphologische Veränderungen der Plasmamembran konnten de Nollin und Borgers nach 24stündiger Inkubation der Zellen mit fungistatischer Miconazol-Konzentration (0,01 - 0,1 µM) feststellen. An der Zellperipherie war eine Wucherung des Plasmalemmas, in Form vermehrter Membranwindungen sowie die Anwesenheit von Vesikeln und lomasomalen Körpern zwischen dem Plasmalemma und der Zellwand erkennbar. Die Zellwand hatte sich verdickt. Hier waren eine Anzahl von Einschlüssen verschiedener Größe und unterschiedlicher elektronischer Dichte erkennbar, die hauptsächlich in Gebieten mit besonderer Dicke der Zellwand und in der Nähe der Zellknopsen auftraten. Bei einer Konzentration von 1 µM Miconazol hatten sich die peripheren Membranveränderungen verstärkt und zusätzlich war im Zellinneren eine Anhäufung von Membranprodukten und eine Verdrängung cytoplasmatischen Materials in die Zellvakuole zu erkennen. Bei der minimalen fungiziden Konzentration von 10 µM Miconazol zeigten sich starke Veränderungen der Zelle: Die Plasmamembran und die Vakuolenmembran waren teilweise oder ganz zerstört. Außerdem waren stark geschwollene und zerrissene Mitochondrien, eine große Anzahl von Fett-Depots, Membranfragmente und aggregierte Ribosomen im lysierten Cytoplasma sichtbar. Zellkern oder Zellkernreste waren nicht mehr zu identifizieren.

Weitere Untersuchungen von de Nollin und Borgers[58] mit einem Rasterelektronenmikroskop zeigten bei niedrigen Miconazol-Konzentrationen (0,01 - 10 µM) eine Verklumpung der Zellen, während in Gegenwart von 100 µM Miconazol eine nekrotische Aggregation von Zellresten zu beobachten war.

Neueste Untersuchungen von de Nollin et al.[59] galten den oxidativen und peroxidativen Enzymen. In cytochemischen und biochemischen Untersuchungen konnten sie in Gegenwart fungistatischer Miconazol-Konzentrationen eine starke Erhöhung der Katalase-Aktivität in Peroxisomen feststellen. Die minimale fungizide Konzentration bewirkte jedoch den totalen Ausfall des Enzyms. Im Gegensatz dazu zeigte die Cytochrom-C-peroxidase schon in Gegenwart fungistatischer Miconazol-Konzentrationen eine merklich verminderte Aktivität. Die minimale fungizide Konzentration bewirkte auch hier einen totalen Ausfall der Enzymaktivität. Die Aktivität der NADH oxidase erhöhte sich bei fungistatischer und fungizider Miconazol-Konzentration.

Die intravenöse Applikation von Miconazol in der klinischen Behandlung machte es notwendig, die Wirkung des Antimykotikums auch auf Erythrozyten zu untersuchen. So stellten Swamy et al.[56] nach 15minütiger Inkubation von 3×10^7 Schaf-Erythrozyten/ml mit 160 µM Miconazol eine 50%ige Hämolyse der Zellen fest. Der Anteil hämolysierter Zellen stieg mit Zunahme der Inkubationszeit und der Miconazol-Konzentration und sank mit Zunahme der Erythrozytenzahl. Weiterhin ließ sich der Anteil hämolysierter Zellen durch die Gegenwart von Blutserum reduzieren. So verringerte sich der Anteil hämolysierter Zellen in Gegenwart von 1% Blutserum um 90%. Swamy et al. konnten nachweisen, daß Miconazol an die Serumproteine IgG und Albumin gebunden wird und so eine Assoziation des Antimykotikums an die Zellmembran verhindert. Ähnliche Ergebnisse wurden mit dem Miconazol-Derivat Econazol erzielt[60-63].

2. AUFGABENSTELLUNG

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es , den molekularen Mechanismus der antimykotischen Wirkung von Miconazol zu charakterisieren.
Als Objekt wurde die Hefe Saccharomyces cerevisiae gewählt. Diese Hefe hat vergleichbare morphologische und physiologische Eigenschaften, wie die in den Untersuchungen von Swamy et al., van den Bossche und de Nollin verwendete Hefe, Candida albicans. Als Beispiel sei hier das Purintransportsystem angeführt, das in beiden Hefen sehr ähnlich ist (Polak und Grenson[64]).
Zur Bearbeitung der gestellten Aufgabe wurden Untersuchungen zu vier Fragenkomplexen durchgeführt:

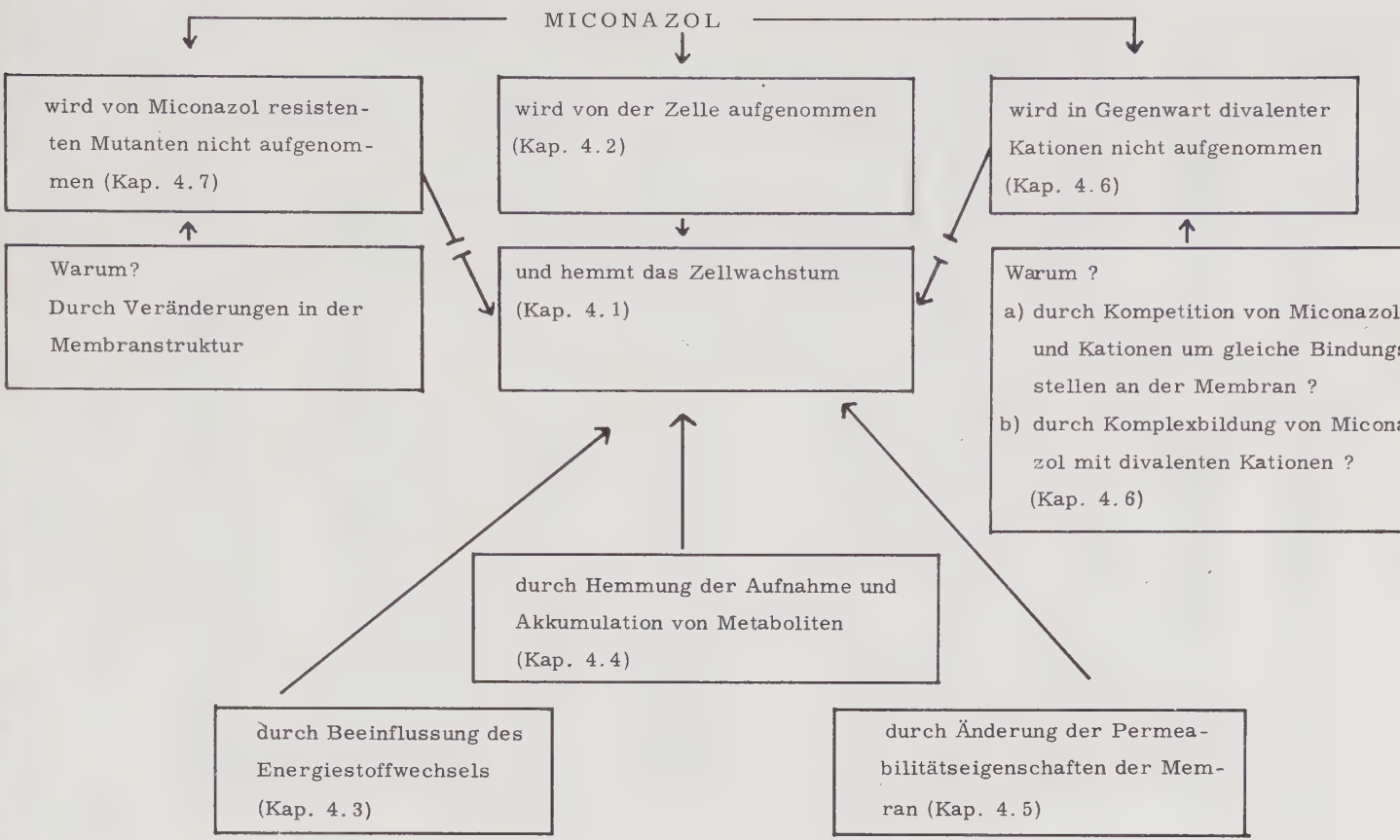
1.] Das Wachstum der Hefe wird in Gegenwart von Miconazol beeinträchtigt. Welche physiologischen Funktionen werden durch Miconazol gehemmt ?

2.] Welche molekularen Veränderungen der Zelle liegen der Einschränkung der physiologischen Funktionen zugrunde ?

3.] Kationen bewirken eine Verminderung der Intensität der Miconazol-Wirkung. Welche molekularen Wechselwirkungen bestehen zwischen Zelle, Kationen und Miconazol ?

4.] Eine Miconazol-resistente Mutante soll isoliert werden. Welche morphologischen und physiologischen Unterschiede bestehen zwischen dieser Mutante und dem Wildtyp ?

Das folgende Schema gibt eine Übersicht der zur Klärung der Fragen durchgeführten Untersuchungen.


MICONAZOL
wird von Miconazol resistenten Mutanten nicht aufgenommen (Kap. 4.7)
wird von der Zelle aufgenommen (Kap. 4.2)
wird in Gegenwart divalenter Kationen nicht aufgenommen (Kap. 4.6)
Warum?
Durch Veränderungen in der Membranstruktur
und hemmt das Zellwachstum (Kap. 4.1)
Warum ?
a) durch Kompetition von Miconazol und Kationen um gleiche Bindungsstellen an der Membran ?
b) durch Komplexbildung von Miconazol mit divalenten Kationen ?
(Kap. 4.6)
durch Hemmung der Aufnahme und Akkumulation von Metaboliten (Kap. 4.4)
durch Beeinflussung des Energiestoffwechsels (Kap. 4.3)
durch Änderung der Permeabilitätseigenschaften der Membran (Kap. 4.5)

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Bezugsquellen und Charakteristik der verwendeten Chemikalien

Janssen Pharmaceutica (Beerse, Belgien)
Miconazol-nitrat (R 14889) wurde sowohl unmarkiert als auch in tritierter Form (spez. Aktivität 178,7 Ci/mol) freundlicherweise von Janssen Research Laboratories zur Verfügung gestellt. Miconazol, ein weißes mikrokristallines Pulver, ist nicht hygroskopisch. Es ist sehr schwach löslich in Wasser und nur mäßig löslich in vielen organischen Lösungsmitteln. Für alle Untersuchungen wurde eine Stammlösung von 5 mM Miconazol in absolutem Äthanol hergestellt und bei Zimmertemperatur aufbewahrt, da Miconazol im Kühlschrank auskristallisierte.

Amersham Buchler (Wenden)
[8-^{14}C] Adenin (54 Ci/mol), [8-^{14}C] Guanin (54 Ci/mol),
[8-^{14}C] Hypoxanthin (54 Ci/mol), [U-^{14}C] Glucose (281 Ci/mol)

Isotopen Dienst West (Sprendlingen)
[U-^{14}C] Aminosäuregemisch (140 Ci/mol)

Difco (Detroit, USA)
Yeast Extract, Yeast Nitrogen Base

New England Nuclear Chemicals (Boston, Mass., USA)
Omnifluor

Schleicher und Schüll (Dassel)
Glasfaserfilter Typ GF 92, Membranfilter Typ BA 85

Industrie Biologique Francaise (Clichy, Frankreich)
Suc d´Helic pomatia (" Schneckenenzym ")

Alle übrigen Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt, bezogen.

1.2 Geräte

Kühlzentrifuge, Sorvall Superspeed RC 2-B
Bio-Dynamics Select-a-Fuge 24
Kolorimeter (MJ) nach Dr. B. Lange
Spektralphotometer, Beckman, DB-GT
Flüssigkeitsszintillationszähler, Beckman Ls-233
pH-Elektrode, Ingold, Typ 405-60
Lyophilisator, Leybold-Hereaus GT 2
Tornado-Emulgator, B. Braun, Melsungen, Typ 853512
Elektrometer, Keithley 602
Amperemeter, Keithley 417
Kompensationsschreiber, Metrawatt, RE 520
Kompensationsschreiber, Servogor S
Multifiltrationsgerät, Millipore Filter Corp.
pH-Meter, Knick Modell 510
Rotationsverdampfer, Heidolph Typ 211
Millipore C-2 Filteranlage zur Herstellung hochreinen Wassers
Warburg-Apparat, B. Braun, Melsungen, Typ V 85

3.1.3 Medien

Vollmedium:
2 % (w/v) Glucose, 1 % (w/v) Difco Yeast Extrakt und 0,5 % (w/v) Pepton in entmineralisiertem Wasser; für festes Vollmedium zuzüglich 2 % (w/v) Agar.

Halbsynthetische Medien:
GYNP: 2 % (w/v) Glucose, 1 % (w/v) Difco Yeast Nitrogen Base und 0,5 % (w/v) Pepton in entmineralisiertem Wasser
ÄYNP: 5 % (w/v) Äthanol, 1 % (w/v) Difco Yeast Nitrogen Base und 0,5 % (w/v) Pepton in entmineralisiertem Wasser.

3.1.4 Stämme

Soweit nicht anders angegeben, wurde für alle Versuche mit Miconazol der Saccharomyces cerevisiae Stamm R XII (von A. Kotyk, Prag, freundlicherweise zur Verfügung gestellt) verwendet.
Für die Induktion von Miconazol-resistenten Mutanten wurde der temperatursensitive Adenin-auxotrophe Stamm A1010 gewählt[65].
Kommerzielle Bäckerhefe wurde von den Deutschen Hefewerken (Hamelner Hefe, Nord-West-Deutsche Hefe- und Spritwerke AG, Hameln) bezogen.

3.1.5 Puffer

Glucose-Citrat-Puffer (GCP): 0,05 M Citratpuffer, pH 5,4, mit 2 % (w/v) Glucose.

3.2 Methoden

3.2.1 Anzucht der Hefezellen

Die Anzucht der Hefezellen erfolgte in GYNP-Medium bei 30°C unter Schütteln der Suspension. Die Zellen wurden in der stationären Wachstumsphase geerntet (nach ca. 24 Stunden). Die Kulturen hatten jeweils einen Anfangstiter von 2×10^6 Zellen/ml und einen Endtiter von etwa 1×10^8 Zellen/ml.

3.2.2 Koloniebildungsfähigkeit der Zellen in Gegenwart von Miconazol

Etwa 300 Zellen aus der frühen stationären Wachstumsphase wurden in Petrischalen auf festes Vollmedium, das verschiedene Konzentrationen an Miconazol enthielt, ausgespatelt. Die Petrischalen wurden 3 Tage bei 30°C aufbewahrt. Anschließend wurden die aufgewachsenen Kolonien, die ein Maß für die überlebenden Zellen darstellen, ausgezählt.

3.2.3 Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen in Gegenwart von Miconazol

Zur Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit wurden etwa 2×10^6 Zellen/ml Medium in Erlenmeyerkolben mit seitlich angesetzten Reagenzgläsern (sog. Nasenkolben) bei 30°C auf dem Schüttler angezüchtet. Die Zunahme des Zelltiters wurde durch Trübungsmessung mithilfe des Lange-Kolorimeters (Grünfilter) verfolgt.

3.2.4 Die Wirkung von Miconazol auf den Atmungs- und Gärungsstoffwechsel der Zelle

Zur Messung des Atmungs- und Gärungsstoffwechsels der Zelle wurden manometrische Messungen mithilfe eines Warburg-Apparates durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden Reaktionsgefäße mit einem Volumen von ca. 15 ml gewählt. Das Wasserbad der Apparatur wurde auf eine konstante Temperatur von 30°C eingestellt. Zum intensiven Gasaustausch zwischen Reaktionsflüssigkeit und dem darüber befindlichen Luftraum wurde eine Schüttelfrequenz von 100 Schwingungen pro Minute und eine Amplitude von 5 cm gewählt.

Zur Versuchsdurchführung wurden 2 x 10^7 Zellen der frühen stationären Wachstumsphase entnommen, abzentrifugiert und in 2 ml unverbrauchtes GYNP-Medium resuspendiert (zur Messung der reinen Sauerstoffaufnahmerate wurde statt GYNP-Medium ÄYNP-Medium gewählt). Die Zellsuspension wurde mit 20 µl Äthanol, der verschiedene Konzentrationen an Miconazol enthielt, versetzt und in den Hauptraum des Reaktionsgefässes überführt. Zur Messung der Sauerstoffaufnahmerate wurde dem Absorptionstrog 0,2 ml einer 3,5 M KOH-Lösung und zur Messung der Kohlendioxidbildungsgeschwindigkeit 0,2 ml entmineralisiertes Wasser zugeführt. Zur Vergrößerung der absorbierenden Oberfläche wurden Harmonikaartig gefaltete Filterpapierchen in die Absorptionströge eingelegt. Unter aeroben Messbedingungen befand sich im Gasraum Luft, unter anaeroben Messbedingungen N_2.

Die Ablesung der Manometerwerte erfolgte über einen Zeitraum von 40 min, in 10minütigem Abstand. Zur Korrektur der Luftdruck- und Temperaturschwankungen lief mit gleichem Flüssigkeitsvolumen ein Thermobarometer mit. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach Umbreit et al.[66].

3.2.5 Aufnahme verschiedener Metaboliten in Gegenwart von Miconazol

3.2.5.1 Glucose-Präinkubation stationärer Zellen

Die Präinkubation der Zellen in Glucose-Citrat-Puffer bewirkt eine starke Stimulation der Aufnahmegeschwindigkeit für Purinbasen[67, 68] und andere Metaboliten, die katalysiert permeieren.
Für die GCP-Präinkubation wurden 50 ml einer Zellsuspension (1×10^8 Zellen/ml) aus der stationären Wachstumsphase abzentrifugiert, mit GCP gewaschen, anschließend in 250ml des gleichen Puffers wieder aufgenommen und für 90 min bei 30°C unter ständigem Rühren und zusätzlicher Belüftung inkubiert.

3.2.5.2 Aufnahmekapazität von Hefezellen für verschiedene Metaboliten in Gegenwart von Miconazol

1×10^7 Zellen/ml GCP wurden zusammen mit 100 µM ^{14}C-Purinbase (0,1 µCi/ml) oder mit 1,43 mM Aminosäuregemisch (0,2 µCi/ml) oder mit 100 µM Glucose (0,05 µCi/ml) in Gegenwart verschiedener Miconazolkonzentrationen bei 25°C im Wasserbad inkubiert.
Nach verschiedenen Zeiten wurden jeweils 1 ml der Zellsuspension auf einem mit Glasfaser-Filtern beschickten Multifiltrationsgerät abfiltriert und mit einer nicht markierten kalten Pufferlösung (1 mM Metabolit in GCP) nachgespült. Die Glasfaser-Filter wurden getrocknet und zur Scintillazionszählung in 2 ml Scintillations-Cocktail gegeben, der 4 g Omnifluor pro Liter Toluol enthielt. Wurden Membranfilter verwendet, so wurden diese ohne vorherige Trocknung in einen Scintillations-Cocktail gegeben, der 4 g Omnifluor und 100 g Naphthalin pro Liter Dioxan enthielt.

3.2.5.3 Spezifische Wechselwirkung von Miconazol mit dem Purintransportsystem

Zur Bestimmung der spezifischen Wechselwirkung von Miconazol mit dem Purintransportsystem wurde die initiale Aufnahmegeschwindigkeit von Purinen in Gegenwart von Miconazol gemessen. Dazu wurden je 10^7 GCP-präinkubierte Zellen in 950 µl Puffer (100 mM Citronensäure/ 200 mM Na_2HPO_4) mit 50 µl Purinbase (54 Ci/mol) in verschiedenenen Konzentrationen gemischt und bei unterschiedlichen pH-Werten inkubiert. Der Inkubationsansatz verblieb 1 min bei 25°C im Wasserbad. Die Inkubationszeit wurde bei pH-Werten über 6.5 auf 3 min ausgedehnt, da in diesen Bereichen die Aufnahme-Aktivität sehr niedrig ist. Die Aufnahme wurde durch Zugabe von etwa 10 ml einer nicht markierten kalten 1 mM Purinlösung gestoppt (Stopplösung). Anschließend wurden die Zellen vom Aufnahmemedium durch Filtration getrennt. Die Filter wurden mit Stopplösung nachgewaschen und zur Scintillationszählung, wie bereits beschrieben, behandelt.

3.2.6 Miconazol als membranotropes Agenz

3.2.6.1 Herstellung von Hefesphaeroplasten

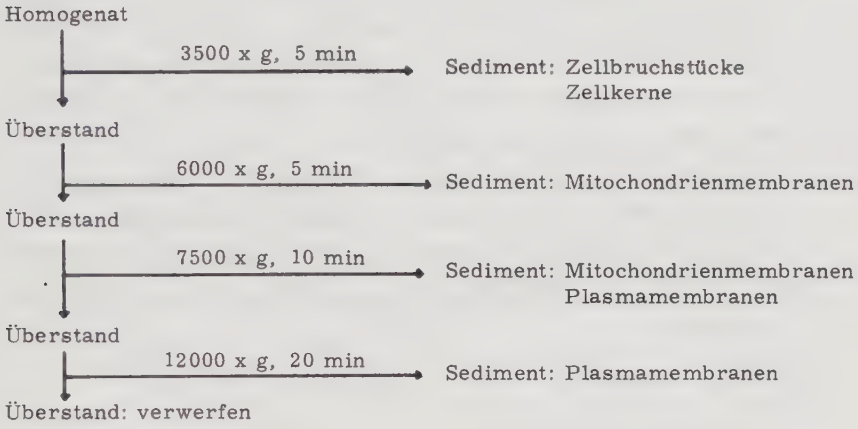
Hefezellen aus der frühen exponentiellen Wachstumsphase wurden in einem Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5 mM EDTA und 5 mM Dithioerythrit) mit einem Zelltiter von 10^8/ml bei 30°C für 15 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit destilliertem Wasser gewaschen. 10^{10} Zellen wurden in einem Gemisch aus

4 ml 1,2 M KCl
2 ml 20 mM Dithioerythrit
und 2 ml Schneckenenzym (Suc d´ Helix pomatia)

bei 30°C inkubiert. Nach etwa 40 min lagen 95% der Zellen als Sphaeroplasten vor. Zur Entfernung des Schneckenenzyms wurden die Sphaeroplasten für 4 min bei 700 x g abzentrifugiert und 2 x mit osmotischem Stabilisator (0,06 M Mannit und 0,25 M Glucose in 50 mM Citratpuffer pH 6) gewaschen.

3.2.6.2 Isolierung der Plasmamembran

Hefesphaeroplasten wurden in einem 1:2,5 mit hochreinem Wasser verdünnten osmotischen Stabilisator überführt und mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator (ca. 10 Auf- und Abwärtsbewegungen) lysiert. Das Homogenat wurde, wie im folgenden Schema dargestellt, fraktioniert zentrifugiert.



Die Plasmamembranen wurden 2 x mit Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,5) gewaschen. Das Material aus 10^{10} Hefesphaeroplasten wurde schließlich in 0,5 ml Puffer aufgenommen.

3.2.6.3 Bestimmung der Effluxgeschwindigkeiten für Purinbasen in Gegenwart von Miconazol

5 ml GCP-präinkubierte Zellen (5 x 10^7/ml) wurden in GCP mit 2 µM ^{14}C-Hypoxanthin (0,1 µCi/ml) für 1 min bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen vom Aufnahmemedium durch Filtration getrennt und in 5 ml Citratpuffer, pH 5,5, der verschiedene Miconazol-Konzentra-

tionen enthielt, resuspendiert. Nach 15 min Inkubation wurden die Zellen auf Glasfaserfiltern abfiltriert und zur Scintillationszählung vorbereitet.

3.2.6.4 Der Einfluß von Miconazol auf die Protonenpermeabilität der Zelle

Zur Messung des Protonenflusses wurde ein Protonengradient zwischen Zellinnen- und Zellaußenmilieu errichtet. Hierzu wurden Zellen aus der stationären Wachstumsphase mit einem Zelltiter von 2×10^7/ml in einer 2%igen Glucoselösung unter Belüftung bei $30^{\circ}C$ für 60 min präinkubiert. Danach wurden 19 ml der Zellsuspension in ein Rührgefäß überführt, in das eine pH-Elektrode eintauchte. Nach einer Äquilibrationszeit von ca. 5 min wurde eine gewünschte Konzentration an Miconazol in absolutem Äthanol der Zellsuspension zugegeben. Die Protonenkonzentration der Suspension wurde mithilfe eines pH-Meters, an das ein Kompensationsschreiber angeschlossen war, kontinuierlich registriert.

3.2.6.5 Aktivitätsbestimmung der membrangebundenen ATPase

Die Aktivität der membrangebundenen ATPase wurde mithilfe eines Autoanalyzers nach der Methode von Ahlers[69-71] bestimmt.

A) Der Präinkubationsansatz für die Aktivitätsbestimmung enthielt:

20 µl isolierte Plasmamembransuspension/$\hat{=}$ 20-40 µg Membranprotein (Die Proteinbestimmung erfolgte nach Schaffner und Weissmann[72])

20 µl Tris-HCl, 500 mM, pH 5

40 µl Miconazol in verschiedenen Konzentrationen

120 µl H_2O

Nach 15minütiger Inkubationszeit wurden 80 µl der Präinkubation in

1,000 ml Tris-HCl, 500 mM, pH 7.5

0,250 ml $MgCl_2$, 10 mM

3,170 ml H_2O

überführt und die Reaktion sofort mit Zugabe von 0,5 ml ATP, 5 mM, pH 7 gestartet.

B) Zur Messung der zeitabhängigen Miconazolwirkung auf die membrangebundene ATPase wurden 100 µl der Plasmamembransuspension in

150 µl Tris-HCl, 500 mM, pH 7,5

100 µl ATP, 5 mM

100 µl $MgCl_2$, 10 mM

100 µl Miconazol, 5 mM

450 µl H_2O

pipettiert. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im Abstand von 2,5 min über einen Zeitraum von 22,5min.

3.2.6.6 Isolierung eines Hefelipidextraktes (modifiziert nach Folch et al.[73, 74])

250 g DHW-Bäckerhefe wurden in einem Lyophilisator gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde in 700 ml Chloroform/Methanol (2:1, v/v) aufgenommen und mithilfe eines Tornado-Emulgators stark durchmischt. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert, der Niederschlag verworfen und der Überstand in einem Vakuum-Rotationsverdampfer bei 40°C eingeengt. Der Rückstand wurde 2 x in 40 ml Chloroform/Methanol (2:1, v/v) aufgenommen und eingeengt. Die am Kolbenrand auskristallierten Salze wurden mit hochreinem Wasser weggewaschen. Der Rückstand wurde anschließend in 60 ml Chloroform/Methanol (2:1, v/v) aufgenommen und im Eisbad stehen gelassen. Der Niederschlag wurde verworfen.

Der Überstand wurde 15 min bei 10 000 x g abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde verworfen. Zum Überstand wurde 1/5 des Volumens 0,73 % (w/v) NaCl-Lösung in hochreinem Wasser zugegeben. Die Suspension wurde gut geschüttelt (Schütteltrichter) und bei 10 000 x g abzentrifugiert. Die obere Phase wurde verworfen, die untere Phase wurde 2 x in Chloroform/Methanol/0,29% (w/v) NaCl (2:48:47) aufgenommen, geschüttelt und bei 10 000 x g abzentrifugiert. Die wässrige Methanolphase wurde beide mal verworfen. Die untere Chloroformphase wurde schließlich eingeengt. Sie enthielt die Membranlipide.

3.2.6.7 Untersuchungen an künstlichen Lipidmembranen

Die Untersuchungen zur Wirkung von Miconazol an künstlichen Lipidmembranen wurden am Fachbereich Chemie der Universität Regensburg durchgeführt.

Für die Messungen wurden planare bimolekulare Lipidmembranen eingesetzt. Diese bilden sich spontan, wenn auf einem kreisförmigen Loch in einer Trennwand zwischen zwei wässrigen Kompartimenten ein Tröpfchen einer Lipidlösung aufgetragen wird. Es entsteht eine Membran (Abb. 3), die durch ihre Fläche und ihre elektrische Leitfähigkeit charakterisierbar ist.

Der Aufbau einer Apparatur zum Herstellen einer planaren bimolekularen Lipidmembran ist in Abb. 4 wiedergegeben. Die Untersuchungen wurden an einem Meßplatz durchgeführt, der neben dieser Apparatur aus einer Lichtquelle und einem Binokular-Mikroskop bestand. Die Lichtquelle war direkt auf das Septum der Meßzelle gerichtet, so daß eine optische Kontrolle der Membranbildung mithilfe des Binokulars möglich war (Abb. 5). Die elektrischen Potentiale zwischen den beiden durch die Membran getrennten Kammern wurden mit Kalomel-Elektroden gemessen. Diese bestanden aus Agar-Brücken, die in eine gesättigte KCl-Lösung eingetaucht waren. Der elektrische Widerstand der Membran wurde mit

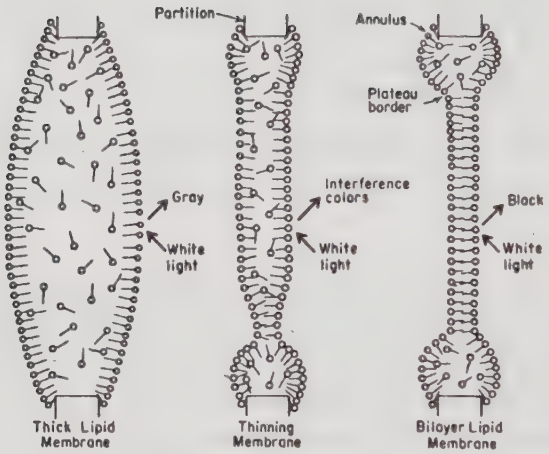
dem Elektrometer bestimmt, indem ein bestimmter Strom vorgegeben wurde, oder er wurde mit dem Amperemeter bestimmt, indem eine bestimmte Spannung vorgegeben und der Strom gemessen wurde. Die Ergebnisse wurden von einem Kompensationsschreiber aufgezeichnet. Für die hier durchgeführten Untersuchungen wurden zwei Typen von Membranen nach dem Prinzip von Mueller-Rudin hergestellt:

1.] Membranen aus oxidiertem Cholesterol

2.] Membranen aus einem Hefelipidextrakt

Da die beiden Membrantypen an unterschiedlichen Meßplätzen und -kammern hergestellt wurden, erfolgt die Beschreibung der Untersuchungsmethoden getrennt:

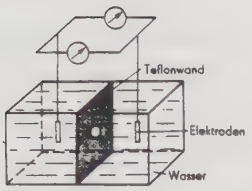
A) Die aus Oxi-Cholesterol hergestellten Membranen wurden in einer doppelseitig verschließbaren Kammer zum Austauschen der Lösungen auf beiden Seiten des Films bei geringer mechanischer Belastung der Membran hergestellt. Die Apparatur wurde von U. Lüschow und J. Schulz-Harder[78, 79] entwickelt. Die Meßzelle bestand aus einem offenen und einem geschlossenen Kompartiment.
Zur Herstellung der Membranen wurde 50 mg Oxi-Cholesterol[80]/ml Dekan gelöst und mit einem Kunststoff-Spatel über das Loch (3 mm Ø) der Teflonscheibe (Septum), die in einem Elektrolyten (Titrisol, pH 6) eingetaucht war, gezogen. Die Messungen zur Widerstandsänderung der Membran in Gegenwart von Miconazol wurden begonnen, sobald sich ein konstanter Widerstand eingestellt hatte (etwa 15 min. nachdem die Membran schwarz wurde). Dazu wurde Miconazol in gewünschter Konzentration mit dem Titrisolpuffer gemischt und mit dem Kammerpuffer des einen Kompartiments ausgetauscht, indem der Kammerpuffer unterschichtet und oben mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt wurde. Zur Untersuchung der Reversibilität der Wirkung von Miconazol auf den elektrischen Widerstand der Membran wurde die Miconazol-haltige Pufferlösung durch reines Titrisol - wie bereits beschrieben - ausgetauscht. Der Austausch der Pufferlösungen wurde mit äußerster Vorsicht durchgeführt, da die Membranen schon bei geringster mechanischer Belastung platzten.



aus: Jain, M.K. The Bimolecular Lipid Membrane[75]

Abb. 3: Bildung der künstlichen Lipidmembran

Wie hier schematisch dargestellt, befindet sich in dem Loch des Septums zunächst eine dickere Schicht aus Lösungsmittel, die sich jedoch durch Auftrieb zunehmend verdünnt. Zuerst von unten anfangend bilden sich bimolekulare Bereiche aus, die sich dann über das ganze Loch ausbreiten. Solange die Membran noch unterschiedliche Dicken aufweist, wird das Licht an der Membran reflektiert und bietet, durch Lichtinterferenzen bedingt, eine Ansicht ineinander fließender Farben. Sobald die Membran vollständig bimolekular ist, wird sie lichtdurchlässig, so daß sie vor dem schwarzen Hintergrund der Meßzelle schwarz erscheint. Die Dicke der Membran beträgt jetzt etwa 50-100 Å .



aus: Grupe, R., " Biologische Forschung an künstlichen Membranen " 76

Abb. 4: Apparatur zum Herstellen einer planaren bimolekularen Lipidmembran.

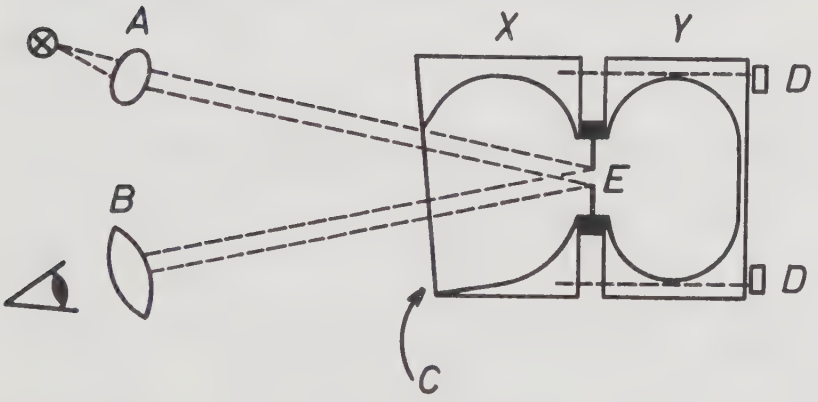


Abb. 5: Meßplatz der Apparatur. Blick von oben.

A: Beleuchtung

B: Stereolupe

C: Acrylglas

D: Schrauben (4) zum Zusammenbau der Kammerhälften x und y

E: Teflonscheibe mit Loch

B) Membranen aus Hefelipidextrakt wurden in einer Meßzelle von O. Lossen[81] angefertigt. Die Meßzelle bestand aus zwei offenen Kompartimenten. Der Hefelipidextrakt wurde in Dekan gelöst (50 mg/ml) und mit einem Rotmarderhaarpinsel über einem Loch (ϕ 1,9 mm) einer Teflonscheibe, die in einen Elektrolyten eingetaucht war, aufgetragen. Der Elektrolyt bestand aus 100 mM NaCl in 10 mM Citratpuffer, pH 5,0. Die Salze wurden vor Gebrauch 5 Stunden bei 700 °C geröstet. Die Teflonscheibe wurde vor dem Auftragen der Membran vorbehandelt, indem sie mit Hefelipidextrakt eingepinselt und mit N_2 trockengeblasen wurde.
Bei diesem Kammersystem konnte kein Pufferaustausch durchgeführt werden. Daher wurde Miconazol direkt dem Kammerpuffer zugeführt und dort durch einen elektrisch angetriebenen kleinen Quirl verteilt.

Zur Auswertung der Meßergebnisse wurden folgende Größen ermittelt:

1.] Der elektrische Widerstand R der Membran errechnet sich aus:

$$R = \frac{U}{I} \quad (\Omega)$$

2.] Die Leitfähigkeit G ist als der reziproke Wert des Widerstandes definiert:

$$G = \frac{1}{R} \quad (S)$$

3.] Die spezifische Leitfähigkeit der Membran G_o ergibt sich aus dem Quotienten von Leitfähigkeit und Membranoberfläche:

$$G_o = \frac{G}{F} \quad \left(\frac{S}{cm^2}\right)$$

Für die Berechnungen wurde als Membranfläche die Lochgröße der Teflonscheibe angenommen.

4. ERGEBNISSE

4.1 Hemmung des Zellwachstums durch Miconazol

Die Hefe Saccharomyces cerevisiae wurde als Modellsystem für die Untersuchungen zur fungiziden Wirkung von Miconazol gewählt. Zunächst war es notwendig zu überprüfen, ob auch diese Spezies in ihrer Lebensfähigkeit durch Miconazol beeinträchtigt wird. Hierzu wurde sowohl der Einfluß von Miconazol auf die Fähigkeit der Zellen, auf festem Nährmedium Kolonien bilden zu können, als auch auf ihre Wachstumsgeschwindigkeit hin untersucht.

4.1.1 Koloniebildungsfähigkeit der Zellen in Gegenwart von Miconazol

Miconazol-Konzentrationen bis 17 μM hatten keinen Einfluß auf die Anzahl der aufgewachsenen Kolonien (Abb. 6). Ihre Form jedoch war schon bei der kleinsten eingesetzten Konzentration von 2 μM verändert. Im Vergleich zur Miconazol-freien Kontrolle sahen die Kolonien kleiner aus und erinnerten in ihrem Phänotyp an atmungsdefiziente petite-Mutanten (Abb. 7). Miconazol-Konzentrationen über 17 μM bewirkten eine starke Verminderung der Koloniebildungsfähigkeit. Die LD_{50} wurde mit (26 ± 2) μM ermittelt (Abb. 6).

4.1.2 Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen in Gegenwart von Miconazol

Schon bei der niedrigsten eingesetzten Konzentration von 0,3 μM Miconazol zeigte sich eine verminderte exponentielle Wachstumsgeschwindigkeit und ein verringerter stationärer Zelltiter. Mit zunehmender

Miconazol-Konzentration wurde auch eine Verlängerung der lag-Phase beobachtet. Konzentrationen über 15 µM hemmten das Zellwachstum fast vollständig (Abb. 8).

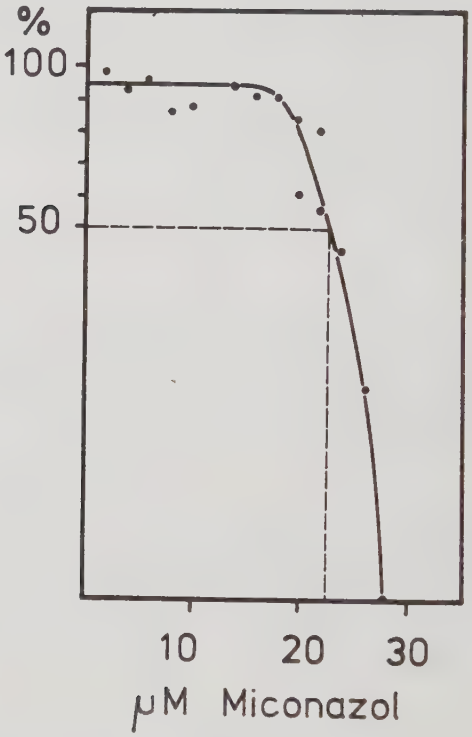
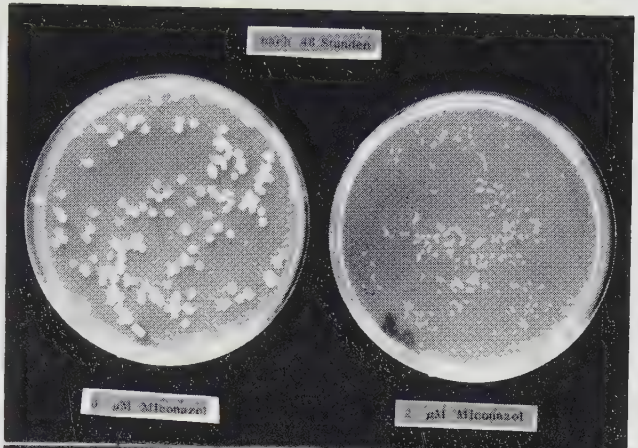


Abb. 6:

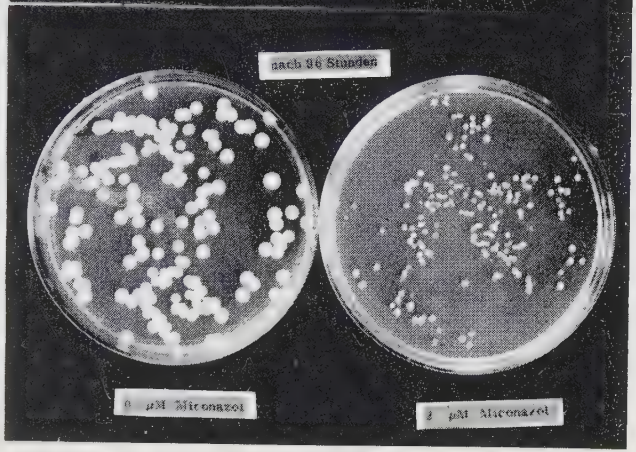
Dosis-Effekt-Kurve der Koloniebildungsfähigkeit der Zellen in Gegenwart von Miconazol.

a



b

c



Phänotypische Veränderung der Kolonieform in Gegenwart von 2 µM Miconazol. Jeweils links im Bild die Miconazol-freie Kontrolle.

7a] nach 2 Tagen Bebrütungszeit

7b] nach 3 " "

7c] nach 4 " "

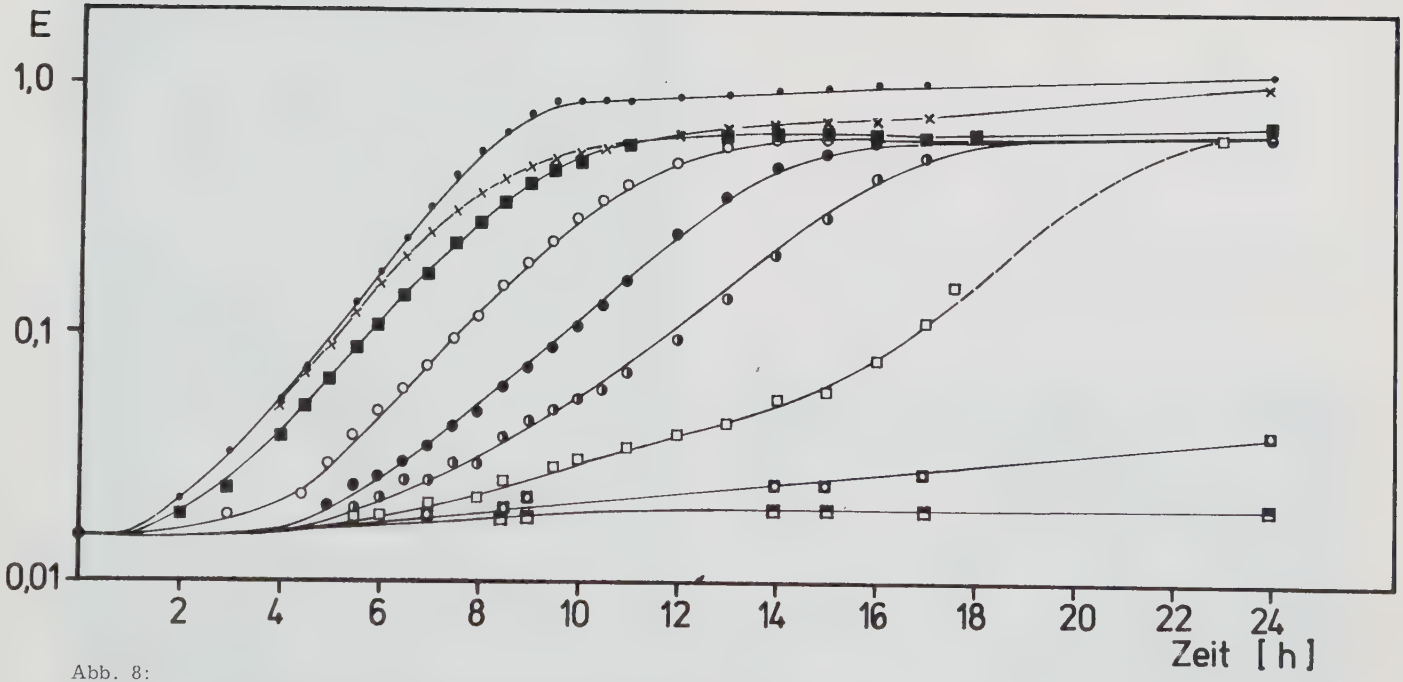


Abb. 8:
Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen in Gegenwart von Miconazol

1	0	µM Miconazol	4	5,0	µM Miconazol	7	12,5	µM Miconazol
2	0,3	µM "	5	7,5	µM "	8	15	µM "
3	3,0	µM "	6	10,0	µM "	9	20	µM "

4.2 Aufnahme von Miconazol durch die Zellen

Um wirksam zu werden, muß Miconazol von der Zelle aufgenommen werden oder zumindest an die Zellwand bzw. die äußere Zellmembran adsorbieren. Der Einfachheit halber werden diese möglichen Wirkungsweisen von Miconazol als " Aufnahme " bezeichnet, ohne daß damit etwas über den molekularen Prozeß ausgesagt sein soll.
Um den Mechanismus der antimykotischen Wirkung von Miconazol zu klären, war es erst einmal notwendig, die Aufnahme-Charakteristika des Fungizids unter den gewählten Bedingungen der geplanten Untersuchungen zu beschreiben.

4.2.1 Aufnahmekapazität der Zellen für Miconazol

Die Aufnahmekapazität der Zellen für Miconazol stieg mit dessen Konzentration (Abb. 9). Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde bei allen eingesetzten Konzentrationen die maximale Aufnahmekapazität der Zellen für Miconazol gemessen. Bei längerer Inkubationszeit nahm die zelluläre Fungizid-Konzentration wieder ab und erreichte einen in etwa konstanten Wert.

4.2.2 Initiale Aufnahmegeschwindigkeit der Zellen für Miconazol

Die initiale Aufnahmegeschwindigkeit der Zellen für Miconazol in Abhängigkeit von der Fungizid-Konzentration ist in Abb. 10 dargestellt.
Sie stieg in dem getesteten Konzentrationsbereich linear an.

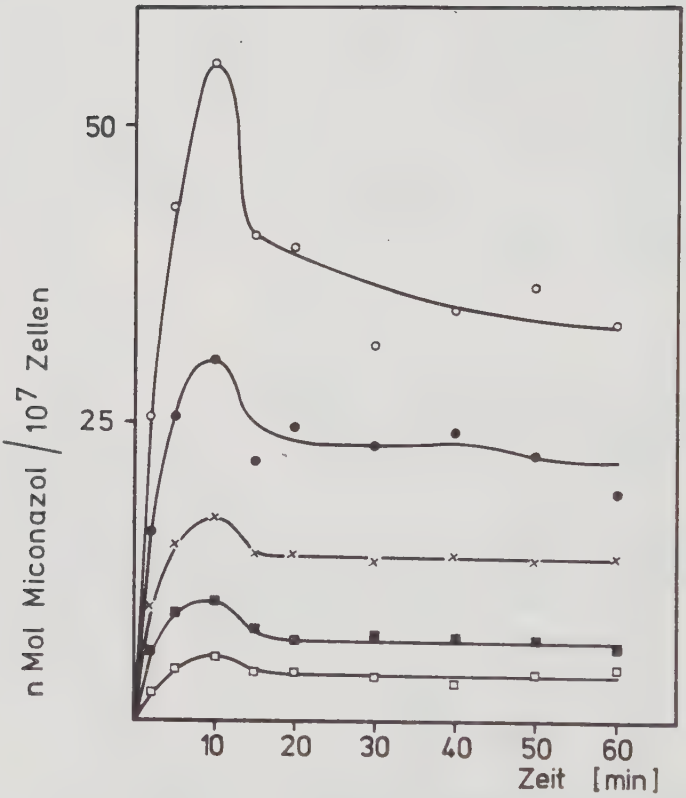


Abb. 9:

Aufnahmekapazität der Zellen für Miconazol
1 x 10^8 Glucose-präinkubierte Zellen wurden in 10 ml Glucose-Citrat-Puffer, der verschiedene Konzentrationen an ^{3}H-markiertem Miconazol (3, 58 Ci/mol) enthielt, inkubiert.

12, 5 µM Miconazol
25 µM "
50 µM "
75 µM "
125 µM "

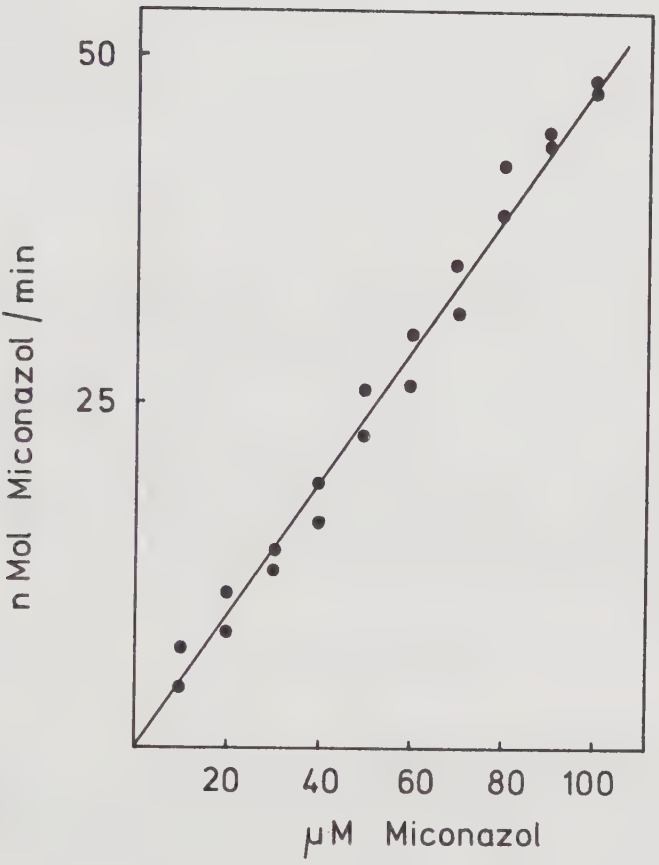


Abb. 10:

Initiale Aufnahmegeschwindigkeit für Miconazol.
2×10^7 Glucose-präinkubierte Zellen wurden in 1 ml Glucose-Citrat-Puffer, der verschiedene Konzentrationen an ^{3}H-markiertem Miconazol (3, 58 Ci/mol) enthielt, für 1 min inkubiert.

4.2.3 Initiale Aufnahmegeschwindigkeit der Zellen für Miconazol in Abhängigkeit von der Zelldichte

Die initiale Aufnahmegeschwindigkeit der Zellen für Miconazol ist nicht nur von der gewählten Miconazol-Konzentration, sondern auch von der eingesetzten Zelldichte abhängig. Wie in Abb. 11 dargestellt ist, nimmt die initiale Aufnahmegeschwindigkeit für Miconazol je Zelle mit steigender Zelldichte ab.

4.2.4 Initiale Aufnahmegeschwindigkeit der Zellen für Miconazol in Abhängigkeit vom pH-Wert des Inkubationspuffers

Die initiale Aufnahmegeschwindigkeit der Zellen für Miconazol ist auch vom pH-Wert des Inkubationspuffers abhängig. Mit Zunahme des pH-Wertes stieg die initiale Aufnahmegeschwindigkeit für Miconazol bis zum vollkommenen Verbrauch des extern angebotenen Miconazols in dem untersuchten Zeitintervall von 1 min linear an (Abb. 12).

4.2.5 Auswaschbarkeit von Miconazol

Zur Prüfung der Auswaschbarkeit von Miconazol wurde den Hefezellen kurzzeitig Miconazol angeboten. Anschließend wurde versucht, das Fungizid durch mehrmaliges Waschen der Zellen zu entfernen. Wie aus Abb. 13 zu entnehmen ist, ließ sich dadurch etwa 95 % des von den Zellen aufgenommenen Miconazols wieder ablösen.

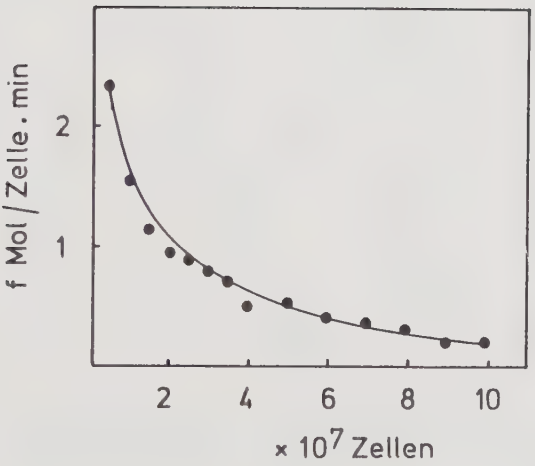


Abb. 11:

Initiale Aufnahmegeschwindigkeit für Miconazol in Abhängigkeit von der Zelldichte.
Glucose-präinkubierte Zellen wurden bei verschiedenem Zelltiter mit 51 μM ^{3}H-markiertem Miconazol (3, 53 Ci/mol) für 1 min inkubiert.

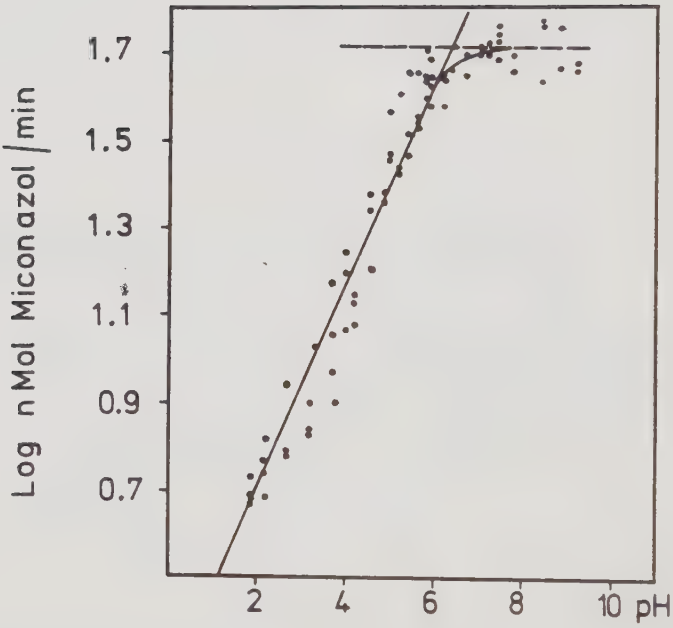


Abb. 12:

Initiale Aufnahmegeschwindigkeit für Miconazol bei verschiedenen pH-Werten des Aufnahmepuffers.
2×10^7 Glucose-präinkubierte Zellen wurden in 1 ml Puffer (Na_2HPO_4/Citronensäure) bei verschiedenen pH-Werten mit 51 μM ^3H-markiertem Miconazol (3, 58 Ci/mol) für 1 min inkubiert.

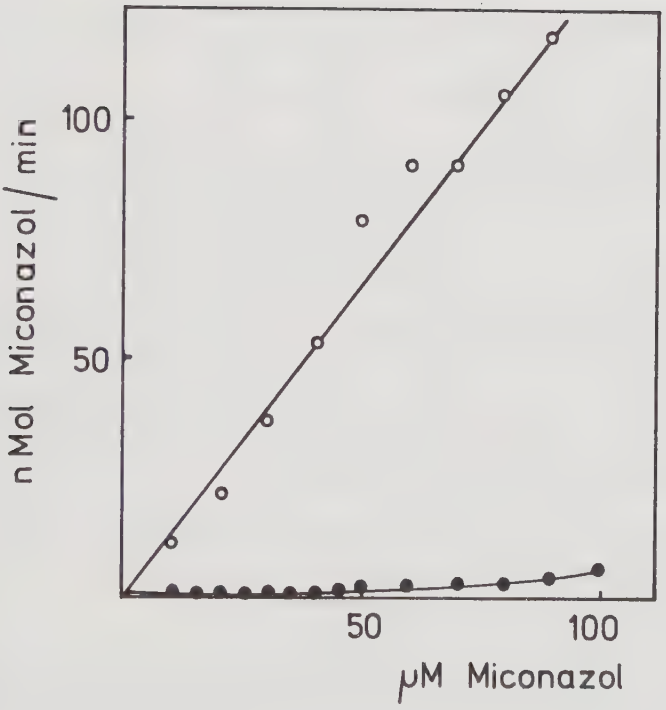


Abb. 13:

Auswaschbarkeit von Miconazol

6×10^7 Glucose-präinkubierte Zellen wurden in 3 ml Glucose-Citrat-Puffer mit ^{3}H-markiertem Miconazol (3, 58 Ci/mol) in verschiedenen Konzentrationen für 1 min inkubiert. Zur Entfernung des Fungizids wurden die Zellen 3 x mit Puffer gewaschen.

gewaschene Zellen ●—●
nicht gewaschene Zellen o—o

4.3 Der Einfluß von Miconazol auf den Energiestoffwechsel der Zellen

4.3.1 Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen in äthanolhaltigem Kulturmedium

Der Effekt nicht-fungistatischer Miconazol-Konzentrationen auf die Größe der Zellkolonien (petite-Phänotyp, Abb. 7) läßt vermuten, daß das Fungizid einen Einfluß auf den Energiestoffwechsel der Zellen hat. Handelt es sich bei den phänotypischen auch um funktionelle petites, so dürften sie Äthanol nicht veratmen können. Um das zu überprüfen, wurde die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen in einem glucosefreien Kulturmedium in Gegenwart verschiedener Miconazol-Konzentrationen gemessen. Als Energiequelle wurde Äthanol angeboten, das von der Hefe nur veratmend genutzt werden kann. Wie aus Abb. 14 ersichtlich, war mit steigender Miconazol-Konzentration eine zunehmende Verlängerung der lag-Phase, eine Verlangsamung der exponentiellen Phase und eine Verringerung des stationären Zelltiters zu beobachten.

Offenbar inhibiert Miconazol die Atmungsaktivität der Zellen. Um diese Vermutung weiter zu untermauern, wurde der Einfluß von Miconazol auf den Atmungsstoffwechsel untersucht.
Da Hefen unter anaeroben Bedingungen die benötigte Energie durch Gärung des Zuckers gewinnen können, wurde auch die Kohlendioxidbildungsgeschwindigkeit der Zellen in Gegenwart von Miconazol gemessen.

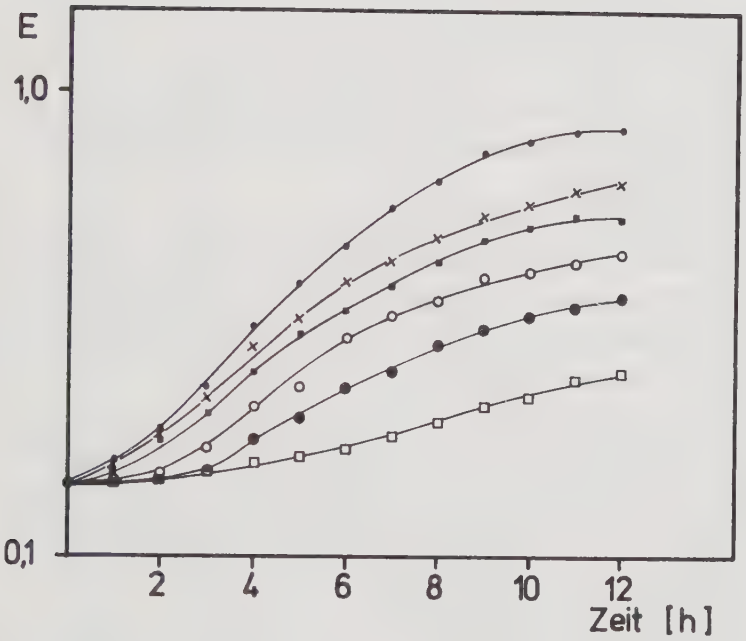


Abb. 14:

Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen in äthanolhaltigem Kulturmedium in Gegenwart verschiedener Miconazol-Konzentrationen.

0	µM	Miconazol
5	µM	"
10	µM	"
20	µM	"
30	µM	"
50	µM	"

4.3.2 Der Einfluß von Miconazol auf den Atmungs- und Gärungsstoffwechsel

Um den Einfluß von Miconazol auf den Atmungs- und Gärungsstoffwechsel zu untersuchen, wurden manometrische Messungen mit einer Warburg-Apparatur durchgeführt.

Hefen sind fakultative Aerobier und können somit die ihnen als Energiequelle angebotene Glucose sowohl veratmen als auch vergären. Unter gewöhnlichen Anzuchtbedingungen (Schüttelkultur) atmen und gären die Hefen gleichzeitig.

Unter vergleichbaren Bedingungen wurde in der ersten manometrischen Untersuchung sowohl die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme als auch die der Kohlendioxidbildung in Gegenwart von Miconazol gemessen. Mit Zunahme der Miconazol-Konzentration war eine deutliche Abnahme sowohl der Atmungs- als auch der Gärungsaktivität der Zellen zu beobachten (Abb. 15). Eine 50%ige Hemmung der Sauerstoffaufnahmegeschwindigkeit wurde mit ca. 50 μM Miconazol erzielt. Im Vergleich dazu wurde die Kohlendioxidbildungsgeschwindigkeit schon bei einer Konzentration von etwa 25 μM um 50 % gehemmt. Geringe Miconazol-Konzentrationen (um 5 μM) verursachten eine leichte Erhöhung der Sauerstoffaufnahmegeschwindigkeit.

In einem weiteren Versuch wurde die reine Atmungsaktivität der Zellen in Gegenwart verschiedener Miconazol-Konzentrationen gemessen. Um eine Gärungsaktivität der Zellen zu verhindern, wurde den Zellen als Energiequelle Äthanol angeboten. Das Ergebnis (Abb. 16) zeigt, daß mit steigender Miconazol-Konzentration eine lineare Abnahme der Sauerstoffaufnahmegeschwindigkeit zu verzeichnen ist. Die Sauerstoffaufnahmegeschwindigkeit wurde in Gegenwart von etwa 12, 5 μM Miconazol um 50 % vermindert.

Zur Messung der Kohlendioxidbildungsgeschwindigkeit der Zellen in Gegenwart von Miconazol wurde der über der Zellsuspension befindliche Gasraum vor Versuchsbeginn mit Stickstoff gespült. Dadurch wurde verhindert, daß die Zellen während der Versuchsdauer Sauerstoff aufnehmen können.

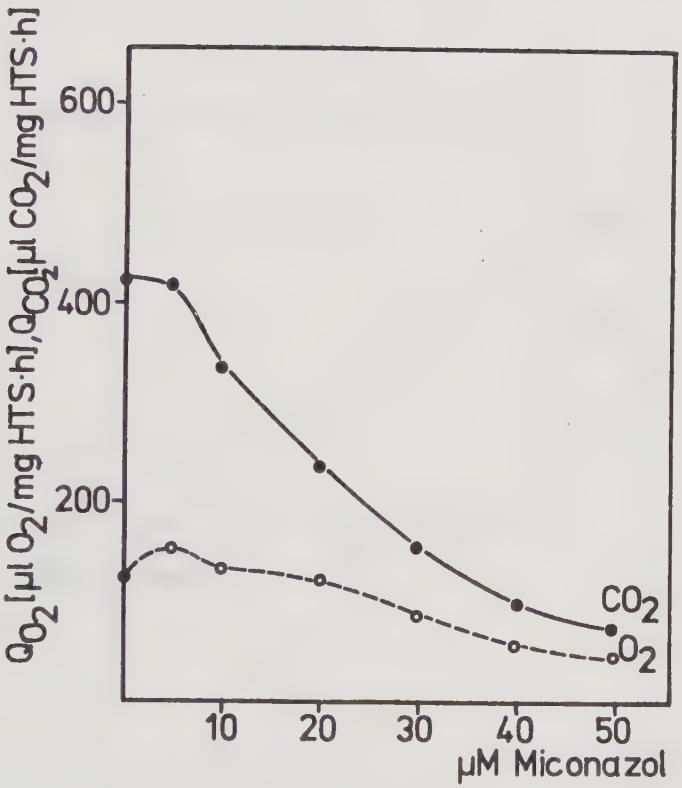


Abb. 15:

Sauerstoffaufnahmegeschwindigkeit und Kohlendioxidbildungsgeschwindigkeit in Gegenwart verschiedener Miconazol-Konzentrationen.
Die Ergebnisse stellen Mittelwerte aus 7 unabhängigen Versuchen dar.

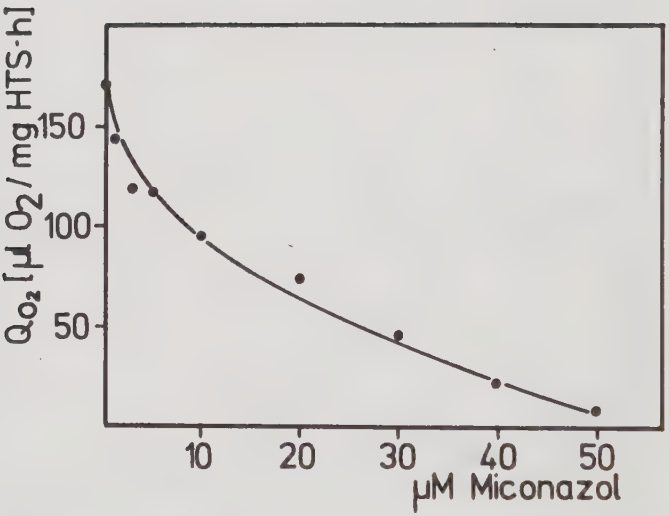


Abb. 16:

Sauerstoffaufnahmegeschwindigkeit in Gegenwart verschiedener Miconazol-Konzentrationen. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte aus 7 unabhängigen Versuchen dar.

Das Ergebnis der Untersuchung (Abb. 17) zeigt mit Zunahme der Miconazol-Konzentration eine starke Abnahme der Gärungsaktivität der Zellen. Eine 50%ige Hemmung der Gärungsaktivität der Zellen wurde in Gegenwart von etwa 12,5 µM Miconazol beobachtet.

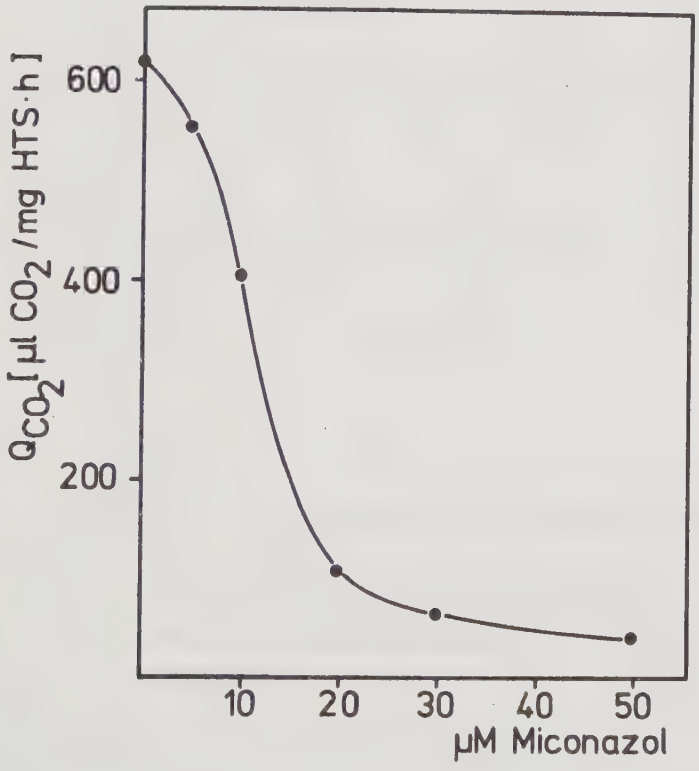


Abb. 17:
Kohlendioxidbildungsgeschwindigkeit in Gegenwart verschiedener Miconazol-Konzentrationen. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte aus 7 unabhängigen Versuchen dar.

4.4 Wirkung vonMiconazol auf Transport und Akkumulation von Metaboliten

Die Inhibition des Zellwachstums von Saccharomyces cerevisiae durch Miconazol könnte auch auf einer Hemmung des Transports stoffwechselaktiver Substanzen zurückzuführen sein. So haben Untersuchungen von van den Bossche[55] mit Candida albicans gezeigt, daß Miconazol bereits in Konzentrationen, die so gering sind, daß sie das Wachstum der Zellen nicht beeinflussen, den Transport von Purinen hemmt. Es war deshalb notwendig zu überprüfen, ob Miconazol auch bei dieser Hefespezies die Aufnahme von wesentlichen Metaboliten hemmt.
Dazu wurde die Aufnahme von Glucose, von verschiedenen Aminosäuren und von Purinen in Gegenwart des Fungizids gemessen. Die von van den Bossche gewählten Versuchsbedingungen, nämlich die Messung der Purinaufnahme während des Zellwachstums, wurden modifiziert, um einen Einfluß intrazellulärer Umwandlungen auf die Aufnahmeuntersuchungen weitgehend zu vermindern. Für die Untersuchungen wurden daher Zellen aus der stationären Wachstumsphase gewählt, die zur Aktivierung ihrer Transportleistungen mit Glucose präinkubiert wurden.

4.4.1 Einfluß von Miconazol auf die Aufnahmekapazität von Glucose

Zuerst sollte geprüft werden, ob Miconazol die Fähigkeit der Zelle, aus dem umgebenden Milieu Glucose aufzunehmen, beeinträchtigt. Nimmt die Zelle nicht genug Glucose auf, so steht ihr nicht ausreichend Energie für Transport und Stoffwechsel zur Verfügung. Das Ergebnis der Untersuchung (Abb. 18) zeigt, daß schon bei der kleinsten eingesetzten Miconazol-Konzentration von 50 μM eine deutliche Verringerung der Aufnahmekapazität der Zellen für Glucose zu beobachten ist. Die Gegenwart von etwa 100 μM Miconazol bewirkte eine 50%ige Hemmung der Aufnahmekapazität.

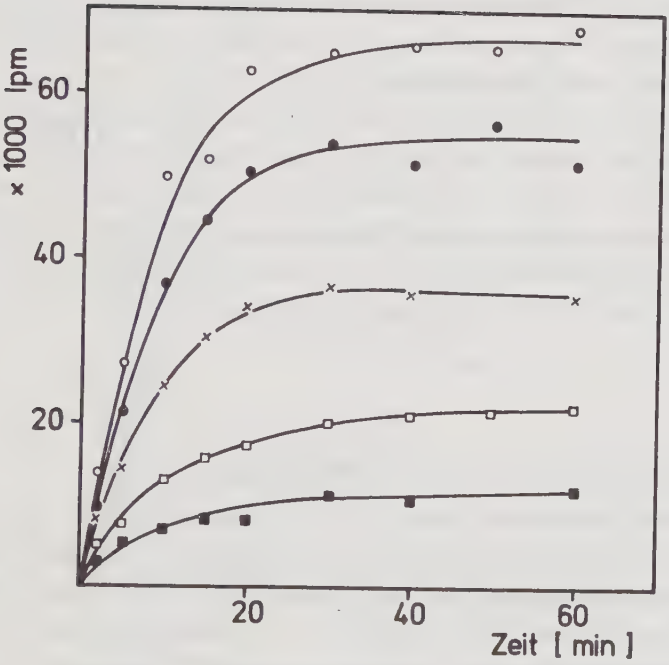


Abb. 18:

^{14}C-Glucose-Aufnahme (100 µM, 0.05 µCi/ml) von Zellen aus der stationären Wachstumsphase in Gegenwart verschiedener Miconazol-Konzentrationen

0 µM Miconazol
50 µM "
100 µM "
150 µM "
200 µM "

4.4.2 Einfluß von Miconazol auf die Aminosäure-Aufnahme

Proteine bilden einen wesentlichen Bestandteil aller Zellen. Die für die Bildung der Proteine benötigten Aminosäuren können von der Zelle entweder aus dem umgebenden Milieu aufgenommen oder selbst synthetisiert werden. Da die Synthese von Aminosäuren sehr energieaufwendig ist, wird die Zelle, sofern möglich, dem umgebenden Milieu Aminosäuren entziehen. Wird die Aufnahme von Aminosäuren durch Miconazol gehemmt, so werden Wachstum und Vermehrung der Zellen beeinträchtigt.

Die Zellen wurden daher sowohl in ihrer initialen Aufnahmegeschwindigkeit als auch in ihrer Aufnahmekapazität für Aminosäuren in Gegenwart von Miconazol untersucht. Abb. 19 und 20 zeigen, daß Miconazol eine verminderte initiale Aufnahmegeschwindigkeit und eine geringere Aufnahmekapazität bewirkt. Eine 50%ige Hemmung konnte jeweils mit etwa 100 μM Miconazol erzielt werden.

4.4.3 Einfluß von Miconazol auf die Purinaufnahme

Weitere wesentliche Substanzen für Wachstum und Zellvermehrung sind die Basen der Nukleinsäuren. Deshalb wurde die initiale Aufnahmegeschwindigkeit und die Aufnahmekapazität für Adenin, Guanin und Hypoxanthin in Gegenwart von Miconazol untersucht. Da das Untersuchungsergebnis für alle drei getesteten Purine gleich war, ist hier exemplarisch die Hypoxanthin-Aufnahme dargestellt. Abb. 20 und 21 zeigen, daß Miconazol eine verminderte initiale Aufnahmegeschwindigkeit und eine geringere Aufnahmekapazität bewirkt. Eine 50%ige Hemmung konnte jeweils mit etwa 100 μM Miconazol erzielt werden.

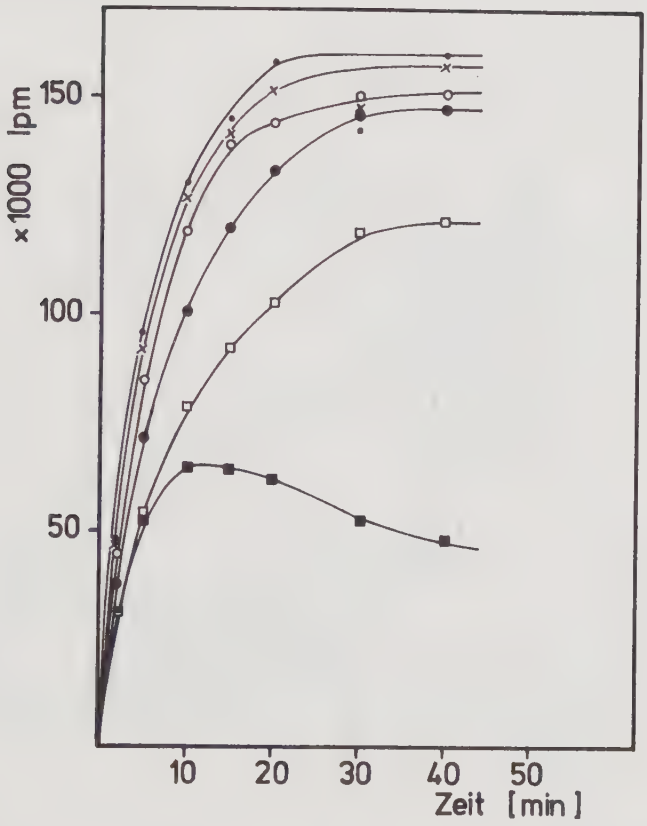


Abb. 19:

^{14}C-Aminosäure-Aufnahme (14, 3 µM, 2.0 µCi/ml) von Glucose-präinkubierten Zellen in Gegenwart verschiedener Miconazol-Konzentrationen:

0	µM	Miconazol
12, 5	µM	"
25	µM	"
50	µM	"
75	µM	"
125	µM	"

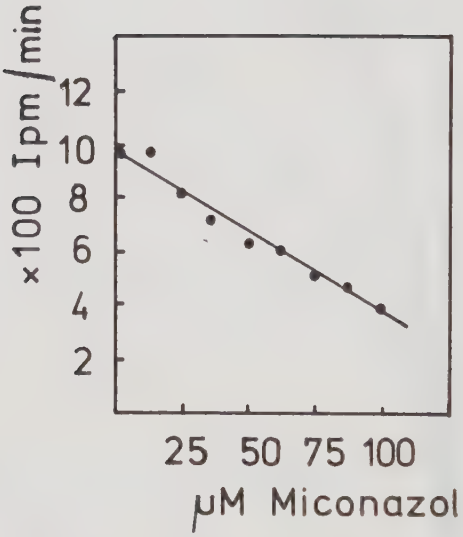


Abb. 20:

Initiale ^{14}C-Aminosäure-Aufnahmegeschwindigkeit (1,43 µM, 0.2 µCi/ml) von Glucose-präinkubierten Zellen in Gegenwart verschiedener Miconazol-Konzentrationen

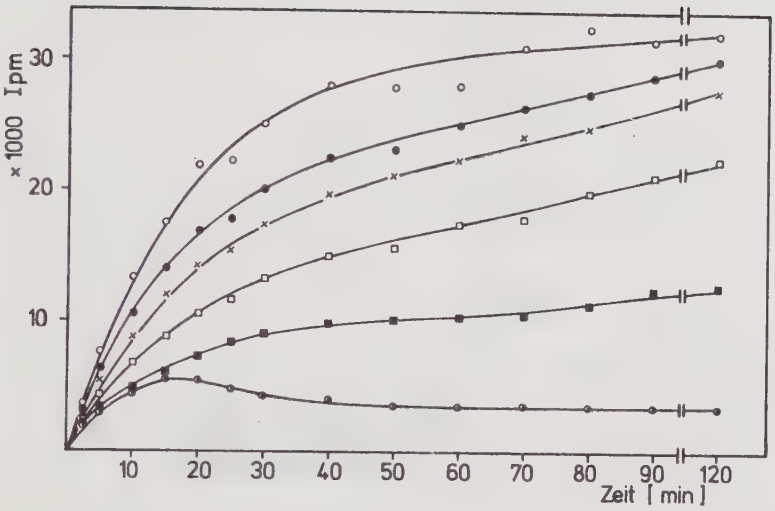


Abb. 21:

^{14}C-Hypoxanthin-Aufnahme (100 µM, 0.15 µCi/ml) von Glucose-präinkubierten Zellen in Gegenwart verschiedener Miconazol-Konzentrationen:

0	µM	Miconazol
12,5	µM	"
25	µM	"
50	µM	"
75	µM	"
125	µM	"

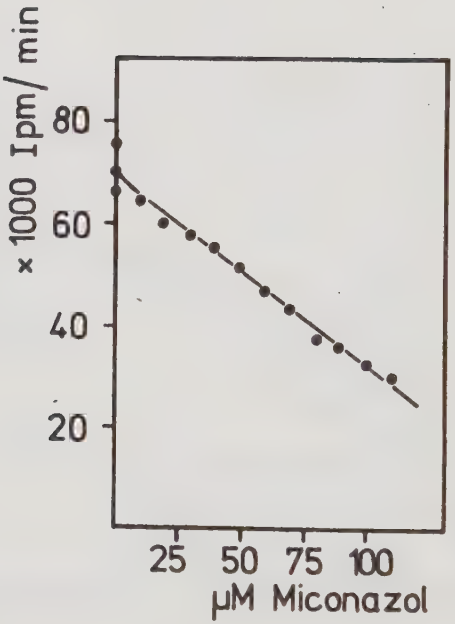


Abb. 22:

Initiale ^{14}C-Hypoxanthin-Aufnahmegeschwindigkeit (2, 78 µM, 0. 15 µCi/ml) von Glucose-präinkubierten Zellen in Gegenwart verschiedener Miconazol-Konzentrationen

.4.4 Gibt es spezifische Wechselwirkungen von Miconazol mit dem Purintransportsystem ?

Die Hemmung der initialen Aufnahmegeschwindigkeit für Aminosäuren und Purine könnte auch auf eine direkte Wechselwirkung von Miconazol mit den jeweiligen Transportsystemen zurückzuführen sein. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde exemplarisch die Möglichkeit einer direkten Wechselwirkung von Miconazol mit dem Purintransportsystem untersucht. Eine Bedingung für die dazu notwendigen kinetischen Untersuchungen ist jedoch, daß die Wirkung des Hemmstoffs reversibel ist.

In einem Vorversuch wurde deshalb die Reversibilität der Miconazol-Hemmung geprüft. Das Ergebnis (Abb. 23) zeigt einen reversiblen Einfluß von Miconazol auf die Purinaufnahme bei Konzentrationen bis etwa 50 μM. Konzentrationen darüber führten zu einer irreversiblen Hemmung der Purinaufnahme.

Zur Bestimmung der spezifischen Wechselwirkung von Miconazol mit dem Purintransportsystem wurden die kinetischen Konstanten K_m und V für die Aufnahme von Adenin in Gegenwart und in Abwesenheit von Miconazol bei verschiedenen pH-Werten ermittelt. Als Inhibitorkonzentration wurde 40 μM Miconazol gewählt. Aus Tabelle 1 ist zu ersehen, daß die Gegenwart von Miconazol im Aufnahmemedium eine signifikante Erniedrigung sowohl der K_m-Werte als auch der V-Werte verursacht. Der Quotient aus V und K_m bleibt jedoch bei identischem pH-Wert annähernd gleich. In diesem Fall spricht man von einer unkompetitiven Hemmung.

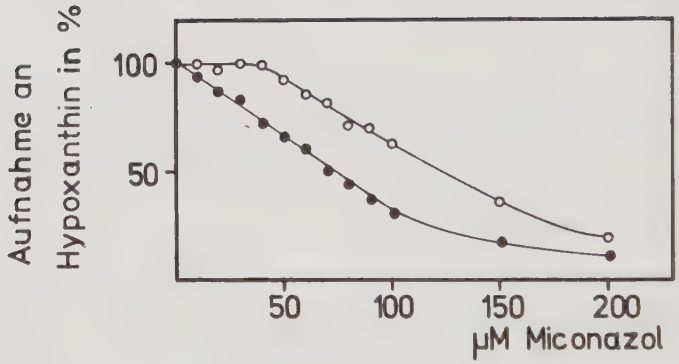


Abb. 23:

Reversibilität der Miconazol-Hemmung

^{14}C-Hypoxanthin-Aufnahme (2,78 µM, 0.15 µCi/ml) durch Glucose-präinkubierte Zellen

a) nach 2minütiger Inkubation mit verschiedenen Miconazol-Konzentrationen ●—●

b) nach 2minütiger Inkubation mit verschiedenen Miconazol-Konzentrationen und anschließendem 3maligen Waschen der Zellen mit Citrat-Puffer zur Entfernung des Fungizids o—o

Tabelle 1

pH	Miconazol-Konzentration [μM]	K_m [μM]	V [10^{-18} · Mol · Zelle^{-1} · Min^{-1}]	V/K_m [10^{-12} l · Zelle^{-1} · Min^{-1}]
2,2	0	0,85	46,2	54,3
	40	0,81	43,5	53,7
2,75	0	1,02	66,8	65,5
	40	0,81	52,0	64,2
3,0	0	0,95	66,8	70,2
	40	0,72	50,6	70,2
3,45	0	0,88	61,1	69,5
	40	0,72	50,6	70,2
4,0	0	0,88	60,3	68,5
	40	0,68	46,2	67,9
4,5	0	1,06	53,4	50,4
	40	0,87	43,3	49,8
5,0	0	1,08	45,6	42,2
	40	0,93	39,0	41,9
5,4	0	1,55	45,2	29,1
	40	1,42	40,7	28,7
6,0	0	3,0	39,0	13,0
	40	1,85	23,6	12,8
6,95	0	20,0	4,45	0,22
	40	10,0	2,08	0,21

Tabelle 1:

Kinetische Konstanten K_m und V für die Aufnahme von Adenin in Gegenwart und in Abwesenheit von Miconazol bei verschiedenen pH-Werten.

4.4.5 Der Einfluß von Miconazol auf die Metabolisierung von Purinen

Untersuchungen zur Akkumulation von Purinbasen haben gezeigt, daß die Purine durch ihr spezifisches Transportsystem annähernd vollständig aus dem Medium entfernt werden (Reichert et al.[67]). In der Zelle werden die Purine durch verschiedene Enzyme des Purinstoffwechsels in Metaboliten umgewandelt. Eine Blockierung dieser Enzyme würde eine Verminderung der Purinaufnahme zur Folge haben. Um zu untersuchen, ob Miconazol einen Einfluß auf die Enzyme des Purinstoffwechsels hat, wurde die Aufnahme und Metabolisierung von Adenin durch die Zellen in Gegenwart verschiedener Miconazol-Konzentrationen gemessen.

Die prozentualen Umwandlungsraten von Adenin in die verschiedenen Metaboliten sind in Tabelle 2 wiedergegeben. Sie zeigen eine Veränderung der Metabolisierungsgeschwindigkeit von Adenin in Gegenwart von Miconazol. Beachtenswert ist, daß mit steigender Miconazol-Konzentration eine prozentuale Zunahme an Adenosin und eine prozentuale Verringerung an Hypoxanthin zu verzeichnen war. Es ist daher möglich, daß Miconazol die Desaminierung von Adenin zu Hypoxanthin inhibiert.

Tabelle 2

Purinderivate	Konzentration von Miconazol während der Aufnahme von Adenin		
	0 µM	100 µM	200 µM
Adenin	1,87 %	3,11 %	12,9 %
Adenosin	4,69 %	12,65 %	16,48 %
Hypoxanthin	45,47 %	30,8 %	22,9 %
Inosin	23 %	24,65 %	21,1 %
Guanosin	3,7 %	5 %	3,99 %
AMP/NAD/ADP	13,7 %	11,67 %	11,42 %
Xanthin	1,35 %	2,3 %	2,55 %
Guanin	1,41 %	2,85 %	3,08 %

Tabelle 2:

Einfluß von Miconazol auf die Metabolisierungsgeschwindigkeit von Purinen.

10^{10} Glucose-präinkubierte Zellen/ml GCP wurden mit 200 µM ^{14}C-Adenin (0,9 µCi/ml) in Gegenwart von 0 µM, 100 µM und 200 µM Miconazol für 45 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Filtration vom Aufnahmemedium getrennt und zur Poolextraktion nach der Methode von Seipel und Reichert[83] behandelt.

Es sind jeweils die prozentualen Umwandlungsraten von Adenin in die einzelnen Purinderivate angegeben.

4.5 Miconazol als membranotropes Agenz

4.5.1 Der Einfluß von Miconazol auf die Stabilität von Hefesphaeroplasten

Der Einfluß von Miconazol auf initiale Aufnahmegeschwindigkeit und Aufnahmekapazität der Zellen für Glucose, Aminosäuren sowie Purine (Kap. 4.4.4) könnte auch durch eine funktionelle Änderung der Plasmamembran bedingt sein. Die Plasmamembran stellt eine natürliche Barriere für eine große Anzahl von Metaboliten dar. Ändern sich die Permeabilitätseigenschaften der Membran, so ändert sich auch die Fähigkeit der Zelle, Metaboliten entgegen dem Konzentrationsgefälle zu akkumulieren. Im Extremfall erfolgt ein Konzentrationsausgleich der Metaboliten zwischen Zellinnen- und -außenmilieu.
Zuerst wurde deshalb überprüft, ob Miconazol die Stabilität der Membran ändert. Dazu wurde die Lyse von Hefesphaeroplasten in Gegenwart von Miconazol untersucht. Sphaeroplasten wurden als Objekt gewählt, weil sie eine starke Instabilität gegenüber mechanischen und chemischen Einflüssen zeigen.
Die Lyse der Sphaeroplasten in Gegenwart verschiedener Miconazol-Konzentrationen wurde rein optisch unter dem Mikroskop verfolgt. Das Ergebnis (Abb. 24) zeigt sowohl mit Zunahme der Zeit als auch mit steigender Miconazol-Konzentration eine anwachsende Zahl lysierter Sphaeroplasten. Die initiale Instabilität der Sphaeroplasten nahm mit steigender Fungizid-Konzentration zu.
Die beobachtete Instabilität der Sphaeroplasten gegenüber Miconazol ließ vermuten, daß auch die Permeabilitätseigenschaften der Membran durch das Fungizid verändert werden.
Es wurde daher der durch Miconazol bedingte Efflux an hoch- und niedermolekularem Material im Wellenlängenbereich von 260 nm bestimmt. Die absolute Konzentration dieses Materials in den Zellen wurde nach Ultraschallbehandlung und Abzentrifugation (8 000 x g) der Sphaeroplasten bestimmt. Aufgrund der Instabilität der Hefesphaeroplasten lagen die Effluxwerte der Kontrollen um 5 % der absoluten Werte.

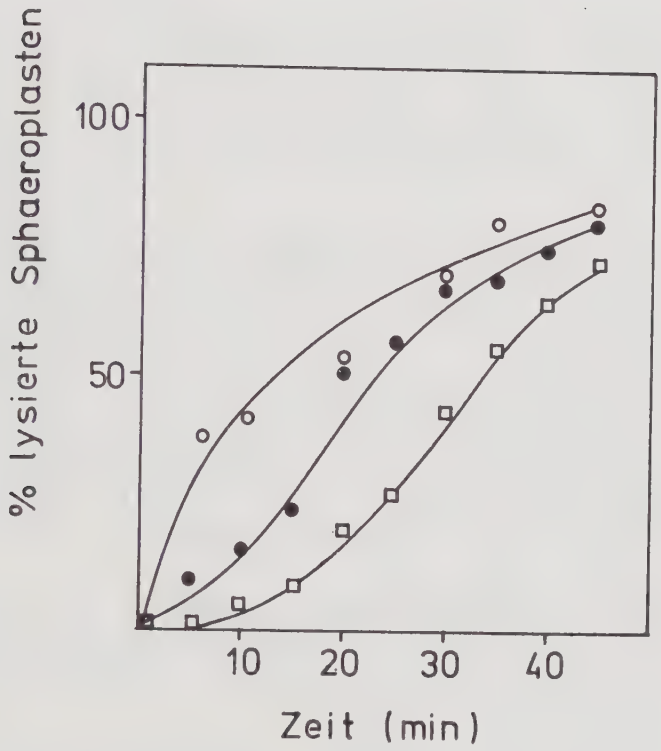


Abb. 24:

Optische Auszählung lysierter Sphaeroplasten
5 x 10^7 Sphaeroplasten/ml Stabilisator wurden in Abhängigkeit von der Zeit bei Zimmertemperatur mit 50 µM □—□ , 100 µM ●—● und 200 µM ○—○ Miconazol inkubiert. Die nicht lysierten Sphaeroplasten wurden mithilfe einer Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Anzahl lysierter Sphaeroplasten in der Kontrolle lag bei 2 %.

Das Ergebnis der Untersuchung zeigt mit steigender Miconazol-Konzentration - bei konstanter Sphaeroplastenzahl - eine Zunahme des Effluxes an 260 nm absorbierendem Material (Abb. 25). Eine steigende Sphaeroplastendichte verursachte dagegen - bei konstanter Miconazol-Konzentration - eine Abnahme des Effluxes (Abb. 26).

In einem weiteren Versuch wurde geprüft, ob die Inkubationstemperatur der Sphaeroplasten einen Einfluß auf die Intensität der Miconazol-Wirkung hat. In der Versuchsdurchführung wurde daher die Effluxgeschwindigkeit cytoplasmatischen Materials aus Sphaeroplasten bei verschiedenen Temperaturen in Gegenwart und in Abwesenheit von Miconazol bestimmt. Werden die Ergebnisse in einem Arrhenius-Diagramm dargestellt (Abb. 27), so liegen die Werte der Miconazol-freien Kontrolle auf einer Geraden. Für die Aktivierungsenergie der Effluxgeschwindigkeit errechnet sich ein Wert von 14,9 KJ x $grad^{-1}$ x Mol^{-1}.

Die Werte der Miconazol-Probe liegen dagegen auf zwei ineinanderübergehenden Geraden, deren Schnittpunkt bei der Temperatur 18,5°C zu finden ist. Für die Aktivierungsenergie der Effluxgeschwindigkeit errechnen sich folgende Werte:

Temperaturbereich unter 18,5°C 14,9 KJ x $grad^{-1}$ x Mol^{-1}

Temperaturbereich über 18.5°C 79,6 KJ x $grad^{-1}$ x Mol^{-1}.

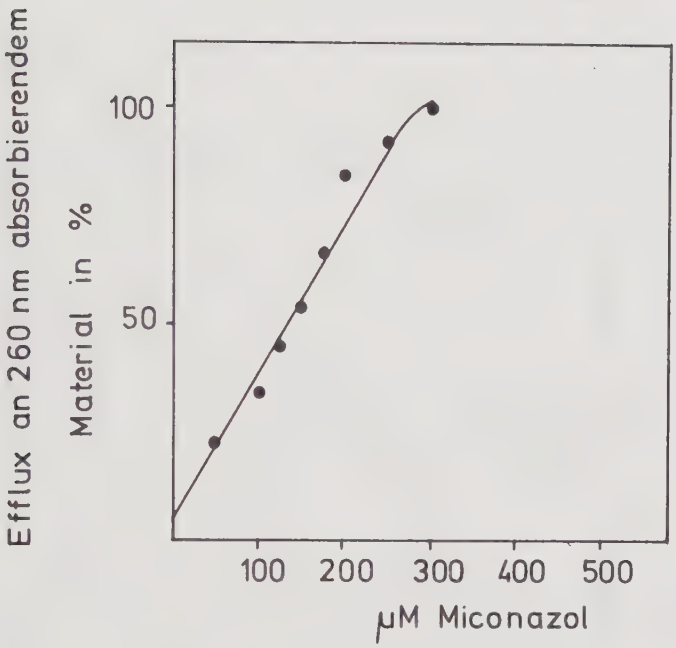


Abb. 25:

Efflux an hoch- und niedermolekularem Material aus Hefesphaeroplasten in Abhängigkeit von der Miconazol-Konzentration. Die Sphaeroplasten (5 x 10^7/ml) wurden in Stabilisator, der Miconazol in verschiedenen Konzentrationen enthielt, für 5 min bei 5°C inkubiert. Nach Abzentrifugation (8 000 x g) der Sphaeroplasten wurde die Extinktion des Überstands bei 260 nm bestimmt.

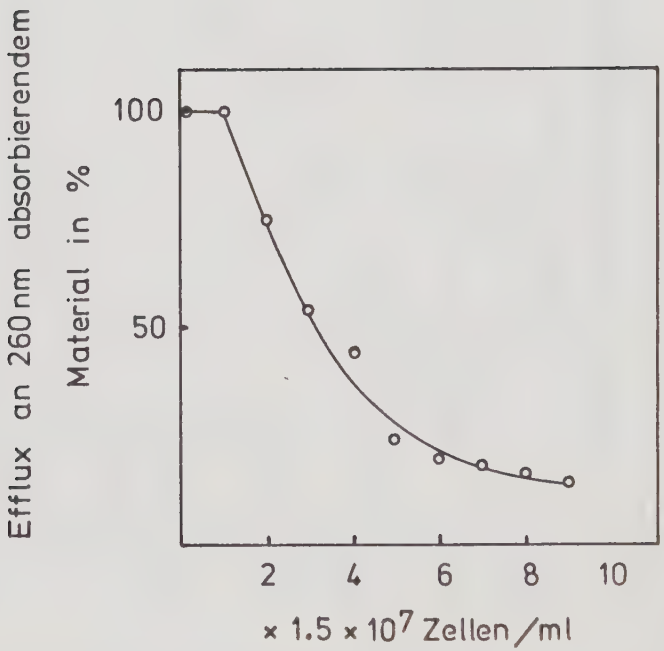


Abb. 26:

Efflux an hoch- und niedermolekularem Material aus Hefesphaeroplasten in Abhängigkeit von der Dichte der Sphaeroplasten. Die Sphaeroplasten wurden in Stabilisator mit 100 µM Miconazol bei 5°C inkubiert. Nach Abzentrifugation (8 000 x g) der Sphaeroplasten wurde die Extinktion des Überstands bei 260 nm bestimmt.

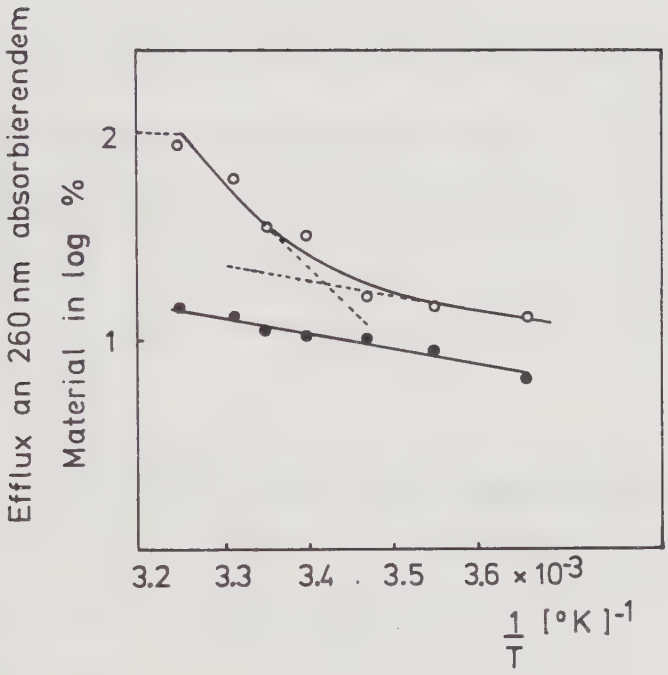


Abb. 27:

Efflux an hoch- und niedermolekularem Material aus Hefesphaeroplasten in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur.
2 x 10^7 Sphaeroplasten/ml Stabilisator wurden mit 100 μM Miconazol 10 min inkubiert. Die Kontrolle enthielt die gleiche Äthanol-Konzentration wie die Miconazol-Probe. Nach Abzentrifugation (8 000 x g) der Sphaeroplasten wurde die Extinktion des Überstands bei 260 nm bestimmt.

o—o mit Miconazol inkubierte Zellen
●—● Miconazol-freie Kontrolle

4.5.2 Durch Miconazol bedingter Efflux von Hypoxanthin

Hefezellen besitzen immer einen gut messbaren Pool an Hypoxanthin und besonders an Inosin. Inosin dient wahrscheinlich als Purinspeicher. Verursacht Miconazol einen Efflux an Hypoxanthin, so ist die Zelle nicht in der Lage, einen Speicherpool an Hypoxanthin und Inosin anzulegen, da Hypoxanthin und Inosin sicherlich im Gleichgewicht zueinander stehen.

In Abb. 28 ist der durch Miconazol induzierte Efflux an Hypoxanthin dargestellt. Konzentrationen an Miconazol bis etwa 40 μM verursachten bei einer Inkubationszeit von 15 min im Vergleich zur Miconazol-freien Kontrolle keinen signifikanten Unterschied im Efflux an Hypoxanthin. Miconazol-Konzentrationen über diesen Wert führten dagegen zu einer starken Zunahme des Hypoxanthin-Effluxes.

4.5.3 Der Einfluß vonMiconazol auf die Ionenpermeabilität der Zelle

Bisherige Untersuchungen über die Aufnahme von Purinen in die Zelle haben gezeigt,

- -- daß Adenin, Guanin und Hypoxanthin energieabhängig transportiert werden (Reichert und Winter[67]),
- -- daß die Assoziation von einem Proton notwendig ist, um ein Hypoxanthin-Molekül an das Transportsystem zu binden (Forêt, Schmidt und Reichert[84]),
- -- daß nach einem Modell von Reichert, Schmidt und Forêt[85] die Aufnahme von Purinbasen mit einem H^+-Symport und einem K^+-Antiport gekoppelt ist. Der Transport eines Hypoxanthin-Moleküls ist verbunden mit der Aufnahme eines Protons und dem Ausstoß eines Kaliumions im stöchiometrischen Verhältnis von 1 : 1 : 1 (Reichert und Forêt[86]).

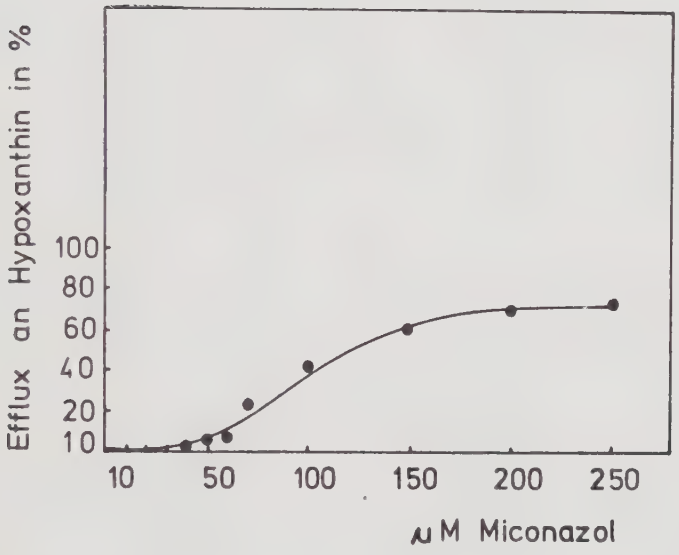


Abb. 28:

Efflux von Hypoxanthin in Gegenwart verschiedener Miconazol-Konzentrationen.
1 x 10^8 Glucose-präinkubierte Zellen/5 ml GCP wurden mit 2,78 mM Hypoxanthin (0,15 Ci/ml) 1 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abfiltriert und 15 min in Citrat-Puffer, der verschiedene Konzentrationen an Miconazol enthielt, resuspendiert. Die in den Zellen verbliebene Radioaktivität wurde gemessen und ins Verhältnis zur Miconazol-freien Kontrolle (≙ 100 %) gesetzt.

Aus den angeführten Untersuchungsergebnissen ist zu ersehen, daß für den Purintransport ein Proton- und Kaliumgradient an der Plasmamembran notwendig ist. Werden diese Gradienten durch eine Änderung der Permeabilitätseigenschaften der Plasmamembran zerstört, so kann die Zelle nicht mehr Purine akkumulieren. Es ergibt sich daher die Frage, ob Miconazol schon in sehr geringen Konzentrationen einen Einfluß auf die Gradienten ausübt und so eine verminderte initiale Aufnahmegeschwindigkeit als auch eine geringere Aufnahmekapazität der Zellen für Purine bewirkt (Kap. 4.4.3). Exemplarisch wurde daher die Wirkung von Miconazol auf den H^+- bzw. OH^--Gradienten untersucht.

Für die Untersuchung war es zunächst einmal notwendig, einen Protonengradienten zwischen Zellinnen- und -außenmilieu herzustellen. Hierzu wurden die Zellen vor Versuchsbeginn mit Glucose präinkubiert. Die Glucose-Präinkubation bewirkte eine Ansäuerung des externen Zellmilieus. Eine anschließende Inkubation der Zellen mit Miconazol in Konzentrationen von 5 µM verursachte einen Anstieg des externen pH-Wertes. In Abb. 29 ist eine der vorgenommenen Messungen exemplarisch dargestellt. Aus einer Reihe von Untersuchungen mit unterschiedlichen Miconazol-Konzentrationen ließ sich schließlich erkennen, daß die Geschwindigkeit der Zunahme des externen pH-Wertes von der eingesetzten Fungizid-Konzentration abhängig ist. Eine Zusammenfassung der einzelnen Ergebnisse ist in Abb. 30 dargestellt. Miconazol-Konzentrationen bis etwa 50 µM verursachten eine langsame, Konzentrationen über 50 µM eine stark steigende Zunahme des externen pH-Wertes.

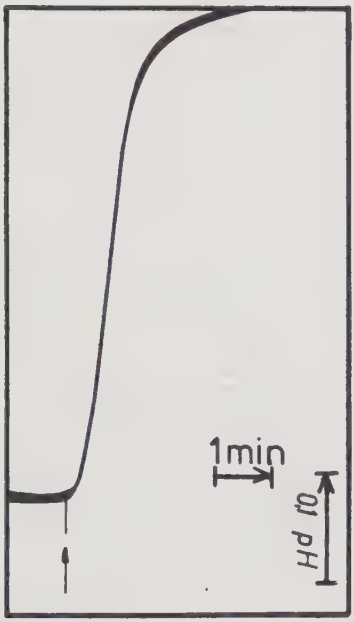


Abb. 29:

Zunahme des externen pH-Wertes durch Inkubation der Zellen mit 100 µM Miconazol.
$3,8 \times 10^8$ Zellen aus der stationären Wachstumsphase wurden 90 min in 19 ml 2%iger wässriger Glucoselösung präinkubiert.
Die Glucose-Inkubation ermöglicht den Aufbau eines Protonen-Gradienten zwischen Zellinnen- und -außenmilieu. Die externe Protonenkonzentration wurde mit dem pH-Meter gemessen.
↑ Zugabe von 100 µM Miconazol (Endkonzentration) bei pH 3,5.

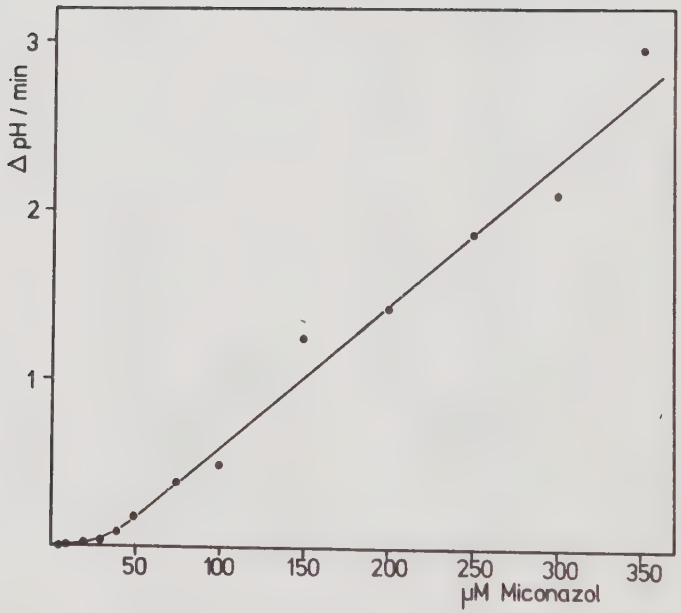


Abb. 30:

Geschwindigkeit der Zunahme des externen pH-Wertes in Abhängigkeit von der Miconazol-Konzentration.
Die Geschwindigkeit der pH-Wert-Zunahme wurde jeweils durch die Tangente im Wendepunkt der Anstiegskurve (vgl. Abb. 29) bestimmt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 6 Einzelmessungen.

4.5.4 Die Wirkung von Miconazol auf die Aktivität der Plasmamembran-ATPase

Untersuchungen von Fuhrmann et al.[87], Rimersma et al.[88], Schibeci et al.[89] u.a. beweisen die Existenz einer ATPase in der Plasmamembran der Hefen. Diese ATPase gilt als ein integrales Membranprotein.
Um zu überprüfen, ob Membranproteine Angriffsziel von Miconazol sind, wurde untersucht, ob Miconazol einen Einfluß auf die Aktivität der ATPase hat.
Da Foury et al.[90] eine Beteiligung der Plasmamembran-ATPase an der Protonentranslokation entsprechend der Mitchell-Hypothese[91] diskutieren, wäre eine Hemmung der ATPase weiterhin ein Hinweis darauf, daß Miconazol auch durch eine Wechselwirkung mit diesem Enzym einen Einfluß auf den Protonengradienten ausübt.

In der Versuchsdurchführung wurde zuerst die Plasmamembran der Hefezelle isoliert (s. Methodenteil). Die Aktivität der ATPase wurde anschließend nach 15minütiger Einwirkzeit verschiedener Miconazol-Konzentrationen gemessen.
Konzentrationen über 50 µM bewirkten schon eine deutliche Verringerung der ATPase-Aktivität (Abb. 31). Eine 50%ige Hemmung des Enzyms wurde in Gegenwart von etwa 200 µM Miconazol festgestellt.

In einem weiteren Versuch wurde geprüft, ob die Dauer der Miconazol-Einwirkung einen Einfluß auf die Intensität der ATPase-Hemmung hat. Dazu wurde bei einer konstanten Miconazol-Konzentration die Aktivität des Enzyms nach verschieden langer Inkubationszeit gemessen. Das Ergebnis der Untersuchung zeigt, daß die Hemmwirkung augenblicklich eintritt und eine längere Miconazol-Einwirkung keine Verstärkung der Hemmwirkung auf die ATPase bedingt (Abb. 32).

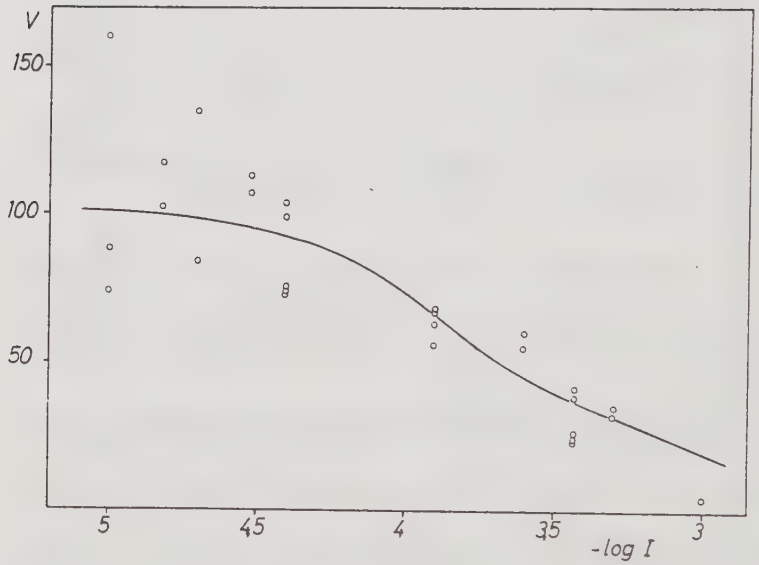


Abb. 31:

Die Aktivität der membrangebundenen ATPase in Abhängigkeit von der Miconazol-Konzentration (I).

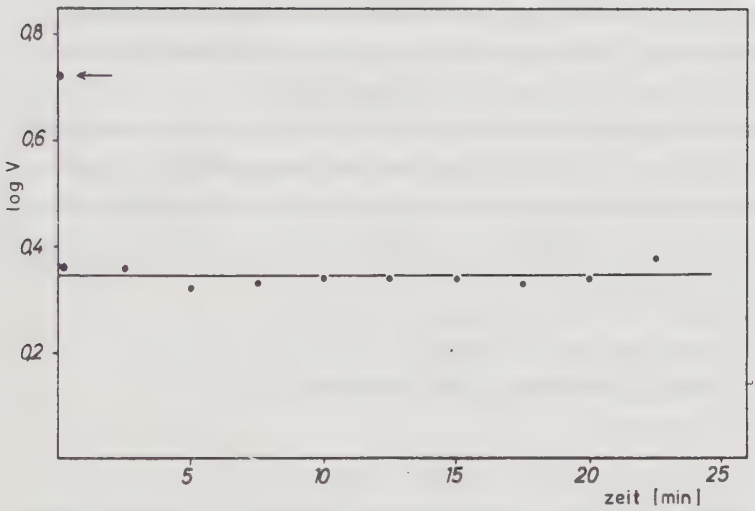


Abb. 32:

Einfluß von 500 µM Miconazol auf die Aktivität (V) der membrangebundenen ATPase in Abhängigkeit von der Einwirkzeit.
← Miconazol-freie Kontrolle

4.5.5 Die Wirkung von Miconazol auf künstliche Lipidmembranen

Die biologische Membran besteht aus Proteinen, Phospholipiden, Steroiden und Kohlenhydraten. Die Grundstruktur jeder Membran ist die bimolekulare Phospholipidschicht, die eine Art Matrix für die anderen Membrankomponenten darstellt. Die Phospholipide haben zusammen mit den Steroiden die Aufgabe, eine selektive Barriere für Metaboliten zu bilden, während die Proteine ein Stützskelett für die mehr oder weniger flüssige Lipidphase bilden. Außerdem besitzen bestimmte Proteine enzymatische Aktivitäten oder nehmen Transport-Funktionen wahr. In der Membran bestehen intermolekulare Wechselbeziehungen zwischen allen Membrankomponenten.
Zur Erforschung von Membranproblemen bedient man sich künstlicher Lipidmembranen, die man schrittweise mit Komponenten der biologischen Membran zu komplizierten Membransystemen erweitern kann.

Zur Erforschung von Membranproblemen stehen 3 einfache Membran-Typen zur Verfügung:

1] Monomolekulare Lipidfilme
2] Planare bimolekulare Lipidmembranen
3] Liposomen

Um zu überprüfen, ob Membranlipide Angriffsziel von Miconazol sind, wurden künstliche Lipidmembranen hergestellt. Permeabilitätsmessungen sollten ergeben, ob Miconazol die Lipidstruktur dieser Membranen beeinflußt.
Für diese Untersuchungen eigneten sich von den oben genannten 3 Typen von Membranen nur die planaren bimolekularen Lipidmembranen, weil

-- monomolekulare Lipidfilme nicht der natürlichen Struktur der Plasmamembran entsprechen,
-- die Messungen von Permeabilitätsänderungen durch Liposomen sehr schwierig sind, da hierzu deren Oberflächengröße bestimmt werden muß.

4.5.5.1 Einfluß von Miconazol auf die elektrische Leitfähigkeit von Membranen aus oxidiertem Cholesterol

Obwohl nach Hunter und Rose[92] das Lipid Ergosterol nur zu 6 % (Trockengewicht) in der Hefezellmembran enthalten ist, nimmt es eine wichtige Rolle ein. So ist unter aeroben Bedingungen Ergosterol erforderlich für das Wachstum der Hefezellen (Andreasen und Stier[93]). Weiterhin lassen Untersuchungen von Rothman und Engelman[94] vermuten, daß Wechselwirkungen zwischen Sterolen und Phospholipiden einen stabilisierenden Effekt auf die Plasmamembran haben.
Um zu überprüfen, ob Miconazol mit Sterolen in Wechselwirkung tritt, wurde die Änderung der elektrischen Leitfähigkeit von künstlichen Membranen aus oxidiertem Cholesterol (5 % Keto- und Hydroxycholesterin und 95 % Cholesterol) in Gegenwart von Miconazol gemessen.
In Abb. 33 ist der Arbeitsverlauf einer der vorgenommenen Messungen dargestellt. Wie hier zu ersehen ist, verursacht Miconazol zwei Effekte:

I] Die Gegenwart von 10 μM Miconazol bewirkt eine Erhöhung der Leitfähigkeit der Lipidmembranen

II] Die Wirkung von 10 μM Miconazol auf die Lipidmembran ist reversibel.

zu I]

Aus einer Reihe von insgesamt 10 Untersuchungen konnten folgende Meßergebnisse erzielt werden:
Die mittlere Leitfähigkeit der Membranen lag bei $2,65 \times 10^{-8} S/cm^2$.
Die Gegenwart von Miconazol in der Meßkammer verursachte eine Erhöhung der mittleren Leitfähigkeit der Membranen. Bei 10 μM Miconazol wurde die Leitfähigkeit um den Faktor $1.65 \pm 0,35$, bei 20 μM Miconazol um den Faktor $3,57 \pm 1,98$ erhöht.

zu II]

Die Reversibilität der durch Miconazol bedingten Leitfähigkeitserhöhung der Membran konnte nach Auswaschen des Fungizids wiederholt gemessen werden.

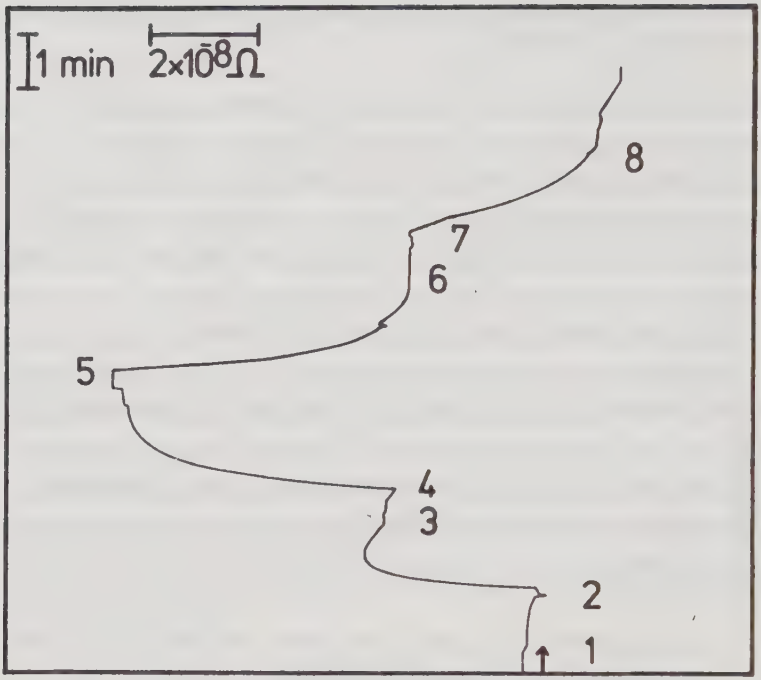


Abb. 33:

Einfluß von Miconazol auf den elektrischen Widerstand einer künstlichen Lipidmembran.
Die einzelnen mit Ziffern markierten Etappen des Versuches bedeuten:

1) Der Widerstand der Membran ist konstant ($8 \times 10^{-8} \Omega$)
2) Der Miconazol-freie Puffer (Titrisol, pH 6) der einen Kammerhälfte der Apparatur (s. Methodenteil) wird gegen einen Miconazol-haltigen Puffer (10 μM Miconazol in Titrisol, pH 6) ausgetauscht. Ein sofortiger Abfall des Widerstands ist meßbar.
3) Der Austausch ist beendet
4) Der Strom wird abgeschaltet, der Widerstand sinkt auf 0 Ω
5) Nach Erdung wird wieder ein Strom angelegt
6) Der Widerstand ist konstant
7) Der Miconazol-haltige Puffer wird gegen den Miconazol-freien ausgetauscht. Die Folge ist eine Erhöhung des Widerstands.
8) Der Austausch ist beendet.

Anschließend an Punkt 8) wurde nochmals ein Pufferaustausch mit Miconazol vorgenommen. Wiederum war eine Erhöhung der elektrischen Leitfähigkeit, bedingt durch die Gegenwart des Fungizids, messbar.

.5.5.2 Einfluß von Miconazol auf die Leitfähigkeit von Membranen aus einem Hefelipidextrakt.

In einem weiteren Versuch wurde der Effekt vonMiconazol auf die Leitfähigkeit von Membranen untersucht, die das spezifische Lipidspektrum der Hefezellmembran aufweisen. Für diese Untersuchungen wurden die Membranlipide aus Bäckerhefe isoliert (s. Methodenteil) und der Extrakt zur Herstellung von künstlichen Membranen eingesetzt.
In Abb. 34 ist exemplarisch die Änderung der Leitfähigkeit von 4 der 9 aufgezogenen Lipidmembranen dargestellt. Durch das offene Kammersystem bedingt, konnte Miconazol nur sukzessive dem Kammerpuffer zugeführt werden. Mit jeder erneuten Zugabe an Miconazol war eine weitere Erhöhung der elektrischen Leitfähigkeit der Membranen feststellbar.
Der jeweilige Anfangs- und Endwert der Leitfähigkeit der einzelnen Membranen ist in Tabelle 3 dargestellt.
Die Ergebnisse zeigen mit steigenden Miconazol-Konzentrationen eine deutliche Zunahme der elektrischen Leitfähigkeit der Membranen.

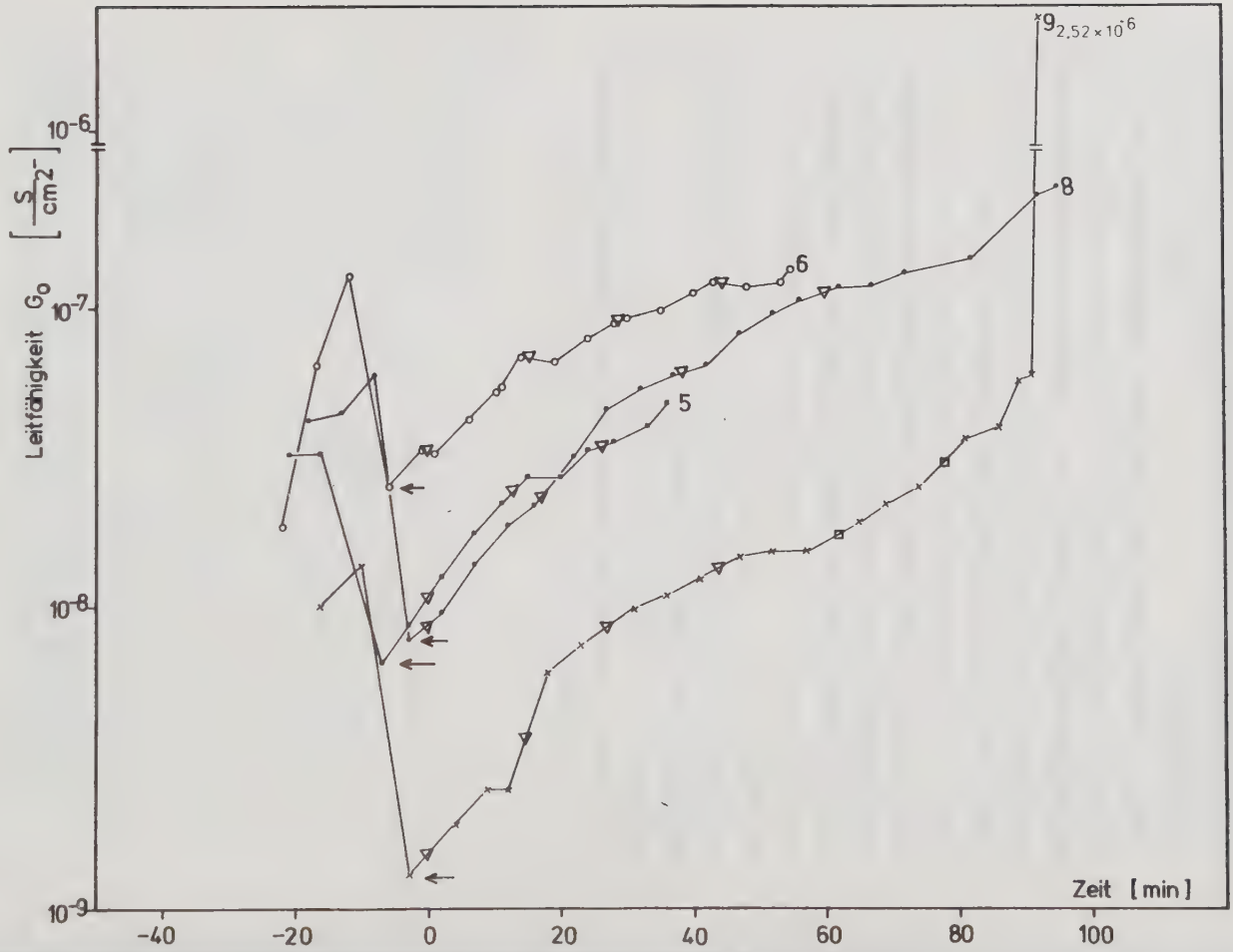

Leitfähigkeit G_o $\left[\frac{S}{cm^2}\right]$
10^{-6}
10^{-7}
10^{-8}
10^{-9}
9 $2{,}52 \times 10^{-6}$
8
6
5
-40
-20
0
20
40
60
80
100
Zeit [min]

Abb. 34:

Ergebnis der Leitfähigkeitsmessung von 4 Filmen aus Hefelipidextrakt. Die Endkonzentrationen an Miconazol der mit Ziffern markierten Filme ist in Tabelle 3 zu finden.

Symbole:

vor ↑ : Die Spannung wird bei einem bestimmten Strom gemessen, um die Kapazität des Films festzustellen

nach ↑ : Der Strom wird bei einer Spannung von - 40 mV gemessen.

→ : Die Spannung wird auf - 100 mV eingestellt

▷ : Zugabe von 6,25 µM Miconazol (Endkonzentration)

□ : Zugabe von 12,5 µM Miconazol (Endkonzentration)

Die erste Zugabe an Miconazol erfolgte zum Zeitpunkt " 0 " .

Tabelle 3:

Film Nr.	Endkonzentration an Miconazol in der Meßzelle [μM]	Leitfähigkeit der Membran vor Miconazol-Zugabe [S]	Leitfähigkeit der Membran nach Miconazol-Zugabe [S]	Erhöhung der Leitfähigkeit durch Miconazol um den Faktor:
1	2,5	$3,12 \times 10^{-8}$	$3,79 \times 10^{-8}$	1,2
2	6,25	$1,22 \times 10^{-7}$	$2,93 \times 10^{-7}$	2,4
3	7,5	$4,18 \times 10^{-7}$	$5,37 \times 10^{-7}$	1,28
4	12,5	$4,03 \times 10^{-7}$	$10,2 \times 10^{-7}$	2,55
5	18,5	$8,8 \times 10^{-9}$	49×10^{-9}	5,57
6	25	$3,39 \times 10^{-8}$	$13,8 \times 10^{-8}$	4,07
7	25	$1,13 \times 10^{-8}$	$13,9 \times 10^{-8}$	12,3
8	25	$7,93 \times 10^{-9}$	257×10^{-9}	32,4
9	50	$1,32 \times 10^{-9}$	2520×10^{-9}	1909

Tabelle 3:

Werte der Leitfähigkeit von 9 Membranen aus Hefelipidextrakt vor und nach Miconazol-Inkubation.

4.6 Verminderung der Miconazol-Wirkung durch Kationen

Untersuchungen von Swamy et al.[18] haben einen Einfluß von divalenten Kationen auf die Wirkung von Miconazol gezeigt. So reduzierten 1 mM Mg^{++} bzw. Ca^{++} bei Zellen von Candida albicans den durch Miconazol bedingten Efflux an 260 nm absorbierendem Material um 34 % bzw. 46 %. Durch Erhöhung der Kationen-Konzentration auf 10 mM konnte der Efflux um 82 % reduziert werden. Weiterhin konnten die Autoren feststellen, daß die Wirkung von Miconazol auf das Zellwachstum von C. albicans in synthetischem Medium [A] geringer ist, als im Sabouraud-Medium [B]. Dieser Effekt wurde auf die höhere Konzentration an divalenten Kationen im synthetischen Medium zurückgeführt. Swamy et al.[18] interpretieren diese Kationen-Effekte mit einer möglichen Konkurrenz von Miconazol mit den divalenten Kationen um gleiche Bindungsstellen an der Plasmamembran.
Die Aufklärung des reduzierenden Effekts der divalenten Kationen auf die Wirkung von Miconazol könnte Aufschluß über die Wirkungsweise von Miconazol geben. Darum wurde in einer weiteren Versuchsreihe der Effekt der divalenten Kationen auf die Intensität der Miconazol-Wirkung näher charakterisiert.

4.6.1 Einfluß von Miconazol auf das Zellwachstum in verschiedenen Medien

Zuerst mußte, entsprechend den Untersuchungen von Swamy et al.[18], überprüft werden, ob Miconazol das Wachstum der Zellen von S. cerevisiae in Vollmedium und in synthetischem Medium unterschiedlich hemmt. Das Ergebnis der Untersuchung zeigt (Abb. 35), daß Miconazol

---

[A] Synthetisches Medium: 2 % Glucose, 0.3 % $(NH_4)_2SO_4$, 0.3 % KH_2PO_4, 0.1 % $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$, 0.1 % $CaCl_2 \cdot 2\,H_2O$ und 30 µg Biotin pro Liter

[B] Sabouraud-Medium: 1 % Difco Neopepton, 2 % Glucose

einen stärkeren Einfluß auf das Wachstum der Zellen in Vollmedium ausübt. So führte eine Konzentration von 15 µM Miconazol in Vollmedium zu einer vollständigen Hemmung, in halbsynthetischem Medium dagegen nur zu einer teilweisen Hemmung der Zellwachstumsgeschwindigkeit. Die unterschiedliche Intensität der Wirkung von Miconazol könnte (a) durch einen Konzentrationsunterschied an divalenten Kationen oder (b) durch einen Unterschied im pH-Wert der beiden Medien bedingt sein. So hatten Untersuchungen zur Aufnahme von ^{3}H-Miconazol (Kap. 4.2.4) ergeben, daß Miconazol im alkalischen Milieu besser von den Zellen aufgenommen wird. Es war deshalb notwendig zu überprüfen, ob Unterschiede im pH-Wert der beiden Medien bestehen. Hierzu wurde die Änderung des externen pH-Wertes der beiden Medien während des Zellwachstums verfolgt. Während der gesamten Meßzeit erwies sich der pH-Wert des Vollmediums höher als der des halbsynthetischen Mediums (Abb. 36). Somit läßt sich die höhere Wirksamkeit von Miconazol im Vollmedium vermutlich auf eine höhere Miconazol-Aufnahme der Zellen, bedingt durch den vergleichbar höheren pH-Wert dieses Mediums, zurückführen.

In einem weiteren Versuch wurden zum Vergleich die pH-Werte der von Swamy et al.[18] benutzten Medien überprüft. Die Messungen ergaben, daß das Sabouraud-Medium einen pH von 5,4 und das synthetische Medium einen pH von 4,15 hat. Die höhere Intensität der Miconazol-Wirkung in dem Sabouraud-Medium - im Vergleich zum synthetischen Medium - ist somit zumindest auch auf den höheren pH-Wert dieses Mediums zurückzuführen.

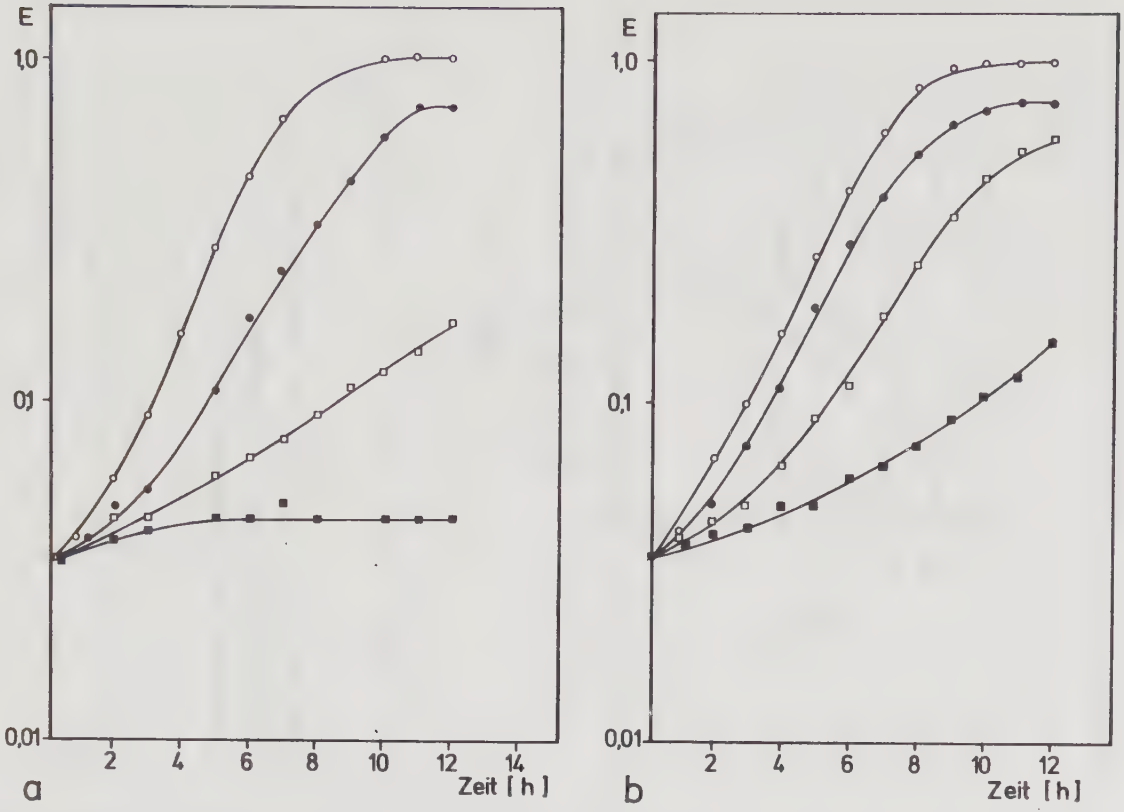


Abb. 35:

Einfluß von Miconazol auf das Zellwachstum in
a] Vollmedium
b] halbsynthetischem Medium

Kontrolle
5 µM Miconazol
10 µM Miconazol
15 µM Miconazol

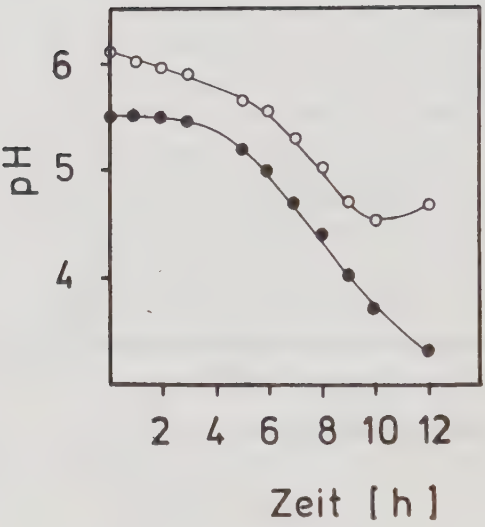


Abb. 36:

Änderung des pH-Wertes während des Zellwachstums in
a] Vollmedium o—o
b] halbsynthetischem Medium ●—●
Der Anfangstiter der Zellen betrug 2 x 10^6/ml

4.6.2 Einfluß mono-, di- und trivalenter Kationen auf die Aufnahme von Miconazol

Konkurriert Miconazol mit divalenten Kationen um gleiche Bindungsstellen an der Plasmamembran, so sollte sich die Aufnahme von Miconazol in die Zellen in Gegenwart der Kationen verringern. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde die Aufnahme von Miconazol in die Zellen in Gegenwart divalenter Kationen gemessen. Gleichzeitig wurde untersucht, ob auch mono- und trivalente Kationen die Aufnahme von Miconazol reduzieren. Das Ergebnis (Tabelle 4) zeigt eine prozentuale Verringerung der Miconazol-Aufnahme in Gegenwart mono-, di- und trivalenter Kationen. Bei gleicher Metallionenkonzentration sank mit steigender Wertigkeit der Kationen die Aufnahmegeschwindigkeit für Miconazol. Weitere Untersuchungen ergaben, daß Anionen keinen Einfluß auf die Aufnahme von Miconazol haben.

4.6.3 Einfluß divalenter Kationen auf den Miconazol-bedingten Efflux von Hypoxanthin

Ist die Aufnahme von Miconazol in die Zelle in Gegenwart divalenter Kationen reduziert, so sollte auch die Wirkung von Miconazol auf die Zellen verringert sein. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde der Efflux an Hypoxanthin in Gegenwart von Miconazol und divalenten Kationen gemessen. Aus Tabelle 5 geht hervor, daß mit steigender Kationen-Konzentration der Miconazol-bedingte Efflux an Hypoxanthin verringert wird.

Tabelle 4

Wertigkeit der Metallionen	Aufnahmegeschwindigkeit von ^{3}H-Miconazol
Miconazol-freie Kontrolle	100 %
Monovalente Kationen	75 %
Divalente Kationen	34 %
Trivalente Kationen	17 %

Aufnahmegeschwindigkeit von ^{3}H-Miconazol in Gegenwart von Kationen.

2×10^{7} Zellen/ml Puffer (Glycin-HCl, pH 3.0) wurden 5 min mit 102 µM ^{3}H-Miconazol (0,358 µCi/ml) in Gegenwart von 20 mM Kationen (KCl, NaCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$, $AlCl_3$, $FeCl_3$) inkubiert.

Die Ergebnisse stellen Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen dar.

Tabelle 5

Miconazol (µM)	$MgCl_2$ (mM)				
	0	2,5	10	50	100
0	100	100	100	100	100
100	54,1	59,7	75,2	83,3	74,4
150	46,0	85,9	88,3	85,5	76,2
200	27,3	57,4	69,2	81,1	73,9
250	18,5	46,3	70,3	76,6	65,2

Tabelle 5:

Einfluß von Mg^{++} auf den Miconazol-bedingten Efflux an Hypoxanthin. 1×10^8 Glucose-präinkubierte Zellen/5 ml GCP wurden eine Minute mit 2,78 mM Hypoxanthin (0,15 µCi/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abfiltriert, in Natriumacetat-Puffer (pH 5,0) mit verschiedenen Miconazol- und $MgCl_2$-Konzentrationen resuspendiert und 15 min inkubiert. Die in den Zellen verbliebene Radioaktivität wurde gemessen und ins Verhältnis zur Miconazol-freien Kontrolle (≙ 100 %) gesetzt.

4.6.4 Abhängigkeit des " Kationen-Effekts " von der Zeit der Kationen-Zugabe

In den vorangegangenen Untersuchungen wurden Miconazol und divalente Kationen jeweils zur gleichen Zeit der Zellsuspension zugeführt. Zur näheren Charakterisierung des " Kationen-Effekts " wurde in der folgenden Untersuchung geprüft, ob divalente Kationen auch zeitlich vor und nach einer Inkubation der Zellen mit Miconazol die Wirkung des Fungizids mindern können. Dazu wurde der Efflux an Hypoxanthin nach einem Zeitraum von 15 Minuten bestimmt. Die Zellen wurden zuerst 7 Minuten mit (a) Miconazol bzw. (b) $MgCl_2$ präinkubiert. Anschließend wurde der Zellsuspension (a) $MgCl_2$ bzw. (b) Miconazol zugeführt.
Aus Abb. 37 ist ersichtlich, daß divalente Kationen kaum einen Einfluß auf die Intensität der Miconazol-Wirkung hatten, wurden die Zellen zuerst mit Miconazol und anschließend mit Kationen inkubiert. Umgekehrt dagegen war eine Reduktion der Miconazol-Wirkung zu beobachten.
Ein gleiches Untersuchungsergebnis konnte erzielt werden, wenn die Präinkubationszeit auf 30 Sekunden gekürzt wurde (ohne Abb.).

4.6.5 Der Einfluß von mono-, di- und trivalenten Kationen auf die durch Miconazol verursachte Ionenpermeabilität der Zelle

Die bisherigen Untersuchungsergebnisse haben gezeigt, daß Kationen die Wirkung von Miconazol auf die Zelle reduzieren. Das trifft auch auf die durch Miconazol bedingte Ionenpermeabilität der Zelle zu.
In Tabelle 6 sind diejenigen Konzentrationen an Kationen angegeben, die notwendig waren, um die Wirkung von Miconazol vollständig zu inhibieren. Besonders gering ist die dafür benötigte Konzentration an trivalenten Kationen. Hier reichte etwa ein Kation aus, um den Effekt von drei Molekülen Miconazol aufzuheben.

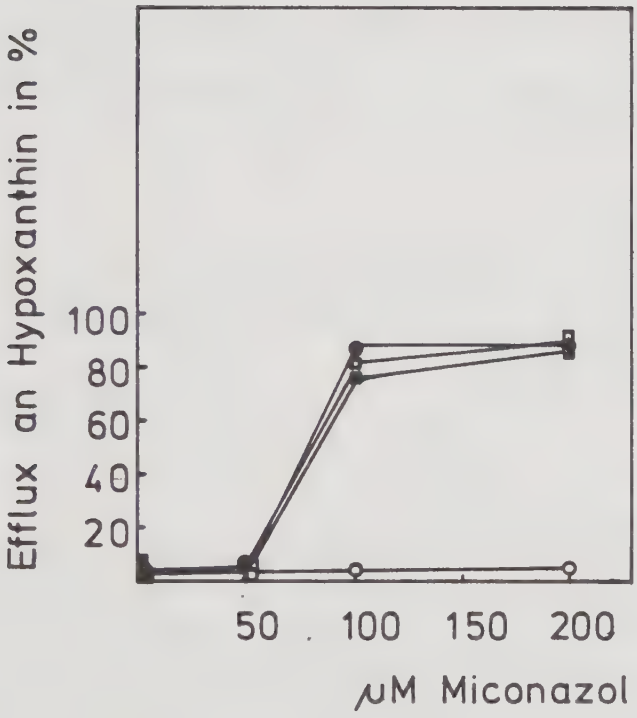


Abb. 37:
Abhängigkeit des " Kationen-Effekts " von der Zeit der Kationen-Zugabe.
1 x 10^8 Glucose-präinkubierte Zellen/5 ml GCP wurden für 1 min mit 2,78 mM ^{14}C-Hypoxanthin (0,15 µCi/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abfiltriert und in Natriumacetat-Puffer (pH 5,0) resuspendiert.
Dieser enthielt:

0, 50, 100, 200 µM Miconazol
0, 50, 100, 200 µM Miconazol
100 mM $MgCl_2$

Nach 7 min Inkubationszeit wurde zugegeben:

---
100 mM $MgCl_2$
0, 50, 100, 200 µM Miconazol
0, 50, 100, 200 µM Miconazol

Die in den Zellen verbliebene Radioaktivität wurde gemessen und ins Verhältnis zur Miconazol-freien Kontrolle (≙ 100 %) gesetzt.

Weitere Untersuchungen haben gezeigt, daß eine vollständige Aufhebung der Miconazol-Wirkung mit den in Tabelle 6 angegebenen Konzentrationen an Kationen nicht gelingt, wenn die Kationen erst kurz nach der Inkubation von Miconazol der Zellsuspension zugeführt werden. In diesem Fall ist lediglich eine leichte Verringerung des Miconazol-Effektes zu beobachten.

Tabelle 6

Wertigkeit der Metallionen	Kationen-Konzentration
Monovalente Kationen	60 mM (NaCl)
Divalente Kationen	8 mM ($MgCl_2$)
Trivalente Kationen	30-40 µM ($FeCl_3$, $AlCl_3$)

Tabelle 6:
Benötigte Konzentrationen an Kationen zur Aufhebung der durch 100 µM Miconazol verursachten Ionenpermeabilität der Zelle. $3,8 \times 10^8$ Glucose-präinkubierte Zellen wurden in 19 ml wässriger Glucoselösung mit verschiedenen Konzentrationen an mono-, di- und trivalenten Kationen inkubiert. Anschließend wurde der Suspension 100 µM Miconazol zugeführt.

6.6 Komplexbildung von Miconazol mit Aluminium

Der Effekt der Kationen auf die Intensität der Miconazol-Wirkung läßt sich wie folgt interpretieren:

1] Kationen blockieren die Membran für Miconazol (Theorie von Swamy et al.[18]).

2] Kationen reagieren mit Miconazol. Es bildet sich ein Kationen-Miconazol-Komplex, der die Zellen im Gegensatz zum freien Miconazol nicht in ihrer Lebensfunktion beeinträchtigen kann.

Zur Klärung der Frage, auf welche Weise Kationen die Intensität der Miconazol-Wirkung reduzieren, sollte zunächst einmal untersucht werden, ob Miconazol mit Kationen komplexiert.

Für die Untersuchung wurden trivalente Kationen gewählt, da diese besonders leicht Komplexe eingehen.

Es wurden 38 mg Miconazol-Nitrat in 3 ml Methanol (≙ 26,44 mM Miconazol) aufgenommen und mit 1,13 g $Al(NO_3)_3 \times 9\ H_2O$ in 3 ml Methanol (≙ 1 M Al-Nitrat) versetzt. Eine spontane Ausfällung der Substanzen ließ sich mit bloßem Auge erkennen. Die Ausfällung wurde dann durch Abkühlen der Lösung beschleunigt.

Das Präzipitat wurde anschließend mit Prof. Dr. R. Frydrych, Fachbereich Chemie der FU, röntgenographisch untersucht. Von dem abgesaugten und auf einer Tonplatte getrockneten Niederschlag wurde eine Pulveraufnahme gemacht. Die Fällung erwies sich als kristallin. Das Diffraktogramm der Kristalle unterschied sich von dem Diffraktogramm des reinen Liganden Miconazol (Abb. 38).

Anschließend wurde der Niederschlag verascht und der Glührückstand als Al_2O_3 angenommen.

Aus der Einwaage und dem Rückstand konnte auf die Zusammensetzung geschlossen werden:

Der Glührückstand betrug 2,73 %.

Unter Berücksichtigung der geringen Einwaage ist der Wert des Glührückstandes mit einem relativ großen Fehler behaftet.

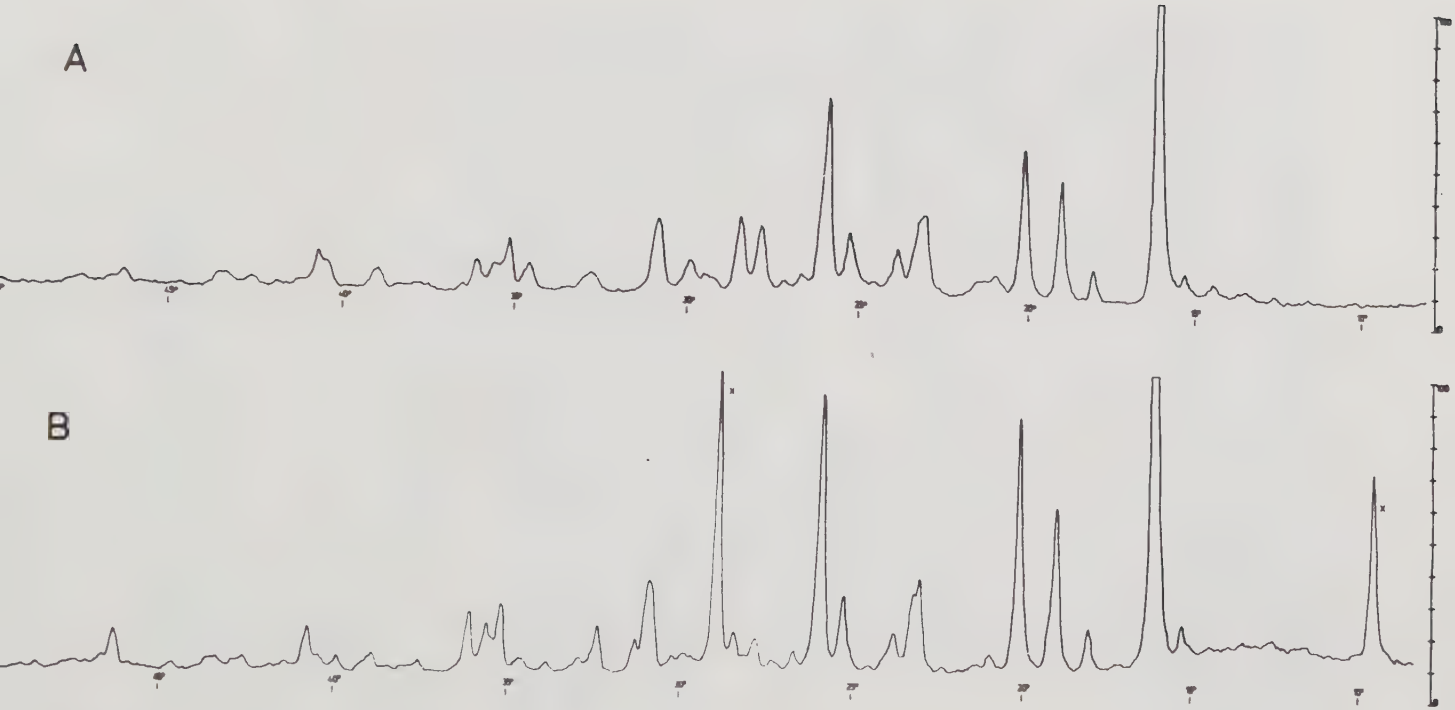


Abb. 38:
Diagramme der Pulveraufnahme von
A] Miconazol-Nitrat B] Miconazol-Nitrat-----Aluminium-Nitrat ----- Komplex
[Diffraktometer-Pulveraufnahme, Cu-K-Strahlung, Ni-Filter, Proport ionalzählrohr]

Es ergeben sich daher folgende Komplexierungsmöglichkeiten von Miconazol-Nitrat mit Aluminium-Nitrat:

1] $3\ R.HNO_3 + Al(NO_3)_3$

$Al\ R_3\ (NO_3)_3 + 3\ HNO_3$ ≙ 3,49 % Glührückstand

2] $4\ R.HNO_3 + Al(NO_3)_3$

$Al\ R_4\ (NO_3)_3 + 4\ HNO_3$ ≙ 2,717 % Glührückstand

(R = Miconazol)

Aus dem Ergebnis der Auswaage ist zu ersehen, daß entweder drei oder vier Miconazol-Moleküle mit dem Aluminium-Ion komplexieren.

.7 Versuche zur Induktion und Selektion von Miconazol-resistenten Mutanten

Um den Mechanismus der Miconazol-Wirkung auf die Membranstruktur näher zu untersuchen, sollten Miconazol-resistente Mutanten isoliert werden.

Zur Induktion von Mutanten wählt man Haplonten. Es wurde daher vom haploiden Stamm A 1010 ausgegangen. Es handelt sich hierbei um einen temperatursensitiven Adenin-auxotrophen Stamm. Er bildet auf einem entsprechenden Testmedium bei 25°C weiße und oberhalb von 30°C rote Kolonien. Die rote Pigmentanhäufung ist auf eine Mutation im ade_2-Locus zurückzuführen (Reichert[65]). Durch die Rotfärbung der Kolonien läßt sich die Hefe schon rein optisch von Kontaminanten unterscheiden.

4.7.1 Induktion und Selektion von Mutanten

Zur Induktion von Mutanten wurden zwei Methoden gewählt:

1] Etwa 300 Zellen wurden der exponentiellen Wachstumsphase einer Kultur entnommen und auf Petrischalen mit festem Vollmedium, das verschiedene Miconazol-Konzentrationen enthielt, ausgespatelt und für 2-10 Sekunden mit ultraviolettem Licht (254 nm) bestrahlt. Die Petrischalen wurden 3 Tage bei 30°C aufbewahrt.

2] Etwa $7,5 \times 10^8$ Zellen aus der stationären Wachstumsphase wurden in 5 ml Salzlösung (85,5 mM NaCl, 0.5 mM $MgSO_4$) aufgenommen und 2 mal gewaschen. 3 ml der Zellsuspension wurden anschließend in 9 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7, der 0,2 M Äthylmethansulfonat enthielt, aufgenommen. Nach 2stündiger Inkubationszeit wurden die Zellen auf Vollmedium-Petrischalen, die verschiedene Konzentrationen an Miconazol enthielten, ausgespatelt. Die Petrischalen wurden 3 Tage bei 30°C aufbewahrt.

Die jeweils rot aufgewachsenen Kolonien wurden isoliert und anschliessend charakterisiert.

4.7.2 Charakterisierung der Mutanten

Der Stamm A 1010 zeigte gegenüber dem Stamm R XII eine etwa 10fach höhere Sensibilität gegenüber Miconazol. So wies der Ausgangsstamm schon bei einer Konzentration von 5 µM Miconazol ein stark verringertes Koloniebildungsvermögen auf. Im Vergleich zum Ausgangsstamm zeigte eine der isolierten Mutanten erst bei wesentlich höheren Miconazol-Konzentrationen (etwa 30 µM) den petite Phänotyp. Die Einkreuzung dieser Miconazol-resistenten Mutanten mit einem Wildtypstamm ergab einen Diplonten, bei dessen Sporulation das Resistenz-Merkmal nicht mehr herausspaltete, so daß anzunehmen ist, daß es sich bei der " Mutation " um einen cytoplasmatischen Defekt handelte.

5. DISKUSSION

In der folgenden Diskussion der Ergebnisse werden zum Vergleich Untersuchungen aus der Literatur mit den Imidazol-Antimykotika Econazol und Clotrimazol an den Objekten Candida albicans, Trichophyton rubrum und an Rinder-Erythrocyten herangezogen.

5.1 Aufnahme von Miconazol in die Zelle

Die Messungen zur Aufnahme von Miconazol in die Zellen erwiesen sich als sehr schwierig, da der Inkubationspuffer keine Kationen enthalten sollte. Diese nämlich vermindern die Aufnahme des Fungizids in die Zellen (Kap. 4.6). Da ein Puffer ohne Kationen nicht zu finden ist, wurden die Aufnahmeuntersuchungen mit einem Puffer durchgeführt, der auch in den weiteren Untersuchungen verwendet wurde.

Die Aufnahmekapazität der Zellen für Miconazol nahm mit steigender Fungizid-Konzentration zu und erreichte nach zehnminütiger Inkubationsdauer den höchsten Wert. Anschließend nahm die zelluläre Fungizid-Konzentration wieder ab. Die Abnahme der zellulären Fungizid-Konzentration ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß zelluläre Substanzen, an die Miconazol gebunden ist, aus der Zelle fließen.
So zeigen auch Untersuchungen in Kap. 4.6, daß Miconazol eine Permeabilisierung der Plasmamembran für zelluläre Substanzen bewirkt. Auch elektronenoptischen Bildern ist zu entnehmen, daß die Gegenwart von Miconazol einen Efflux cytoplasmatischer Bestandteile verursacht (de Nollin et al.[58]).
Die Abnahme der initialen Aufnahmegeschwindigkeit der Zellen für Miconazol mit steigender Zelldichte deutet darauf hin, daß die Zellen nur eine bestimmte Anzahl spezifischer Bindungsstellen für Miconazol

besitzen. Die Messungen zur initialen Aufnahmegeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Fungizid-Konzentration zeigen, daß, unabhängig von der eingesetzten Konzentration, immer etwa 40-45% des angebotenen Miconazols aufgenommen werden. Vermutlich wird das Molekül nur in einer bestimmten Konformation aufgenommen.

Die vorstehenden Ergebnisse erwiesen sich als vergleichbar mit denjenigen von Swamy et al.[56], der die Aufnahme von Miconazol unter ähnlichen Bedingungen bei Erythrocyten untersucht hat.

Die initiale Aufnahmegeschwindigkeit der Zellen für Miconazol erwies sich als abhängig vom pH-Wert des Inkubationspuffers. Diese Untersuchung ist jedoch mit dem Fehler behaftet, daß mit steigendem pH-Wert auch die Konzentration an monovalenten Kationen (Na^+) zunahm. Monovalente Kationen hemmen jedoch die Aufnahme von Miconazol (Kap. 4.6). Zur genauen Bestimmung der pH-abhängigen Miconazol-Aufnahme sind daher weitere Untersuchungen notwendig. Dem vorliegenden Versuchsergebnis kann entnommen werden, daß Miconazol besser in der deprotonierten Form aufgenommen wird. Da Miconazol im sauren pH-Bereich entgegen seiner hohen Fettlöslichkeit (der Logarithmus des Verteilungskoeffizienten im Octanol-Wasser System beträgt 5,87) nur schlecht aufgenommen wird, ist zu vermuten, daß die Ladung am Stickstoff des Imidazolringes von Miconazol die Aufnahme des Fungizids in die Lipidphase der Zellstrukturen behindert. Analog hierzu konnten auch Kern und Zimmermann[95] mit Econazol zeigen, daß die Atmung der Zellen (C. albicans und S. cerevisiae) umso stärker gehemmt wird, je höher der pH-Wert des Inkubationspuffers ist.

Dagegen zeigen Swamy et al.[96], daß die Miconazol-bedingte Freisetzung lysosomaler Enzyme im alkalischen pH geringer als im sauren ist. Dieses Ergebnis steht mit den anderen im Widerspruch. Es läßt sich damit erklären, daß die Experimentatoren verschiedene Puffer mit unterschiedlich hoher Kationen-Konzentration verwendet haben. Kationen haben jedoch einen reduzierenden Effekt auf die Miconazol-Wirkung (Kap. 4.6).

Viele Antibiotika, wie z.B. die Polyen-Antibiotika, binden irreversibel an die Plasmamembran der Zellen. Die Bindung von Miconazol dagegen erwies sich als reversibel. Auch Untersuchungen in Kap. 4.5.5.1 zeigen eine reversible Bindung von Miconazol an künstliche Lipidmembranen. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis dafür, daß Miconazol reversibel an lipidhaltige Zellstrukturen bindet.
Die Ergebnisse zur Aufnahme von Miconazol in die Zelle deuten darauf hin, daß Miconazol entsprechend seinem Verteilungskoeffizienten und in Abhängigkeit der Ladung am Imidazolring reversibel an bestimmte Zellstrukturen bindet.

2 Einfluß von Miconazol auf das Wachstum und auf den Stoffwechsel der Zellen

Untersuchungen zum Zellwachstum von S. cerevisiae in Gegenwart von Miconazol zeigen, daß diese Hefe ähnlich empfindlich gegenüber dem Fungizid ist wie die Hefe C.albicans (Swamy et al.[18], Sawyer et al.[20]). Auch Kern und Zimmermann[95] fanden bei Abtötungsversuchen keinen signifikanten Unterschied in der Empfindlichkeit beider Hefen gegenüber dem Fungizid Econazol.
Die Inhibition der Koloniebildungsfähigkeit der Zellen durch Miconazol zeigt eine biphasige Dosis-Effekt-Kurve. Ein petite-Phänotyp der Zellkolonien war schon unterhalb fungistatischer Miconazol-Konzentrationen zu beobachten. Untersuchungen zum Atmungsstoffwechsel der Zellen in Gegenwart von Miconazol zeigen, daß diese phänotypischen petites funktionell bedingt sind.
Eine 50%ige Hemmung der Zellatmung konnte in Gegenwart von etwa 12,5 μM Miconazol beobachtet werden. Im Vergleich hierzu zeigen Untersuchungen von Kern und Zimmermann[95] sowie von Raab und Gmeiner[97] eine 50%ige Hemmung der Atmung mit etwa 100 μM Econazol.

Für die Hemmung der Atmung ist somit eine geringere Konzentration an Miconazol als an Econazol notwendig. Dieses Ergebnis läßt sich (a) mit einer höheren Wirksamkeit von Miconazol, (b) mit einer unterschiedlichen Konzentration an Kationen in den eingesetzten Medien (Kationen vermindern die Wirkung von Miconazol) oder aber (c) mit unterschiedlichen Untersuchungsmethoden erklären.
Die angewendeten Methoden unterscheiden sich in folgenden Punkten:

1] In der Zeitdauer der Messungen
[Die Intensität der Miconazol-Wirkung steigt mit Zunahme der Zeit]

2] In der eingesetzten Zelldichte
[Mit steigender Zellzahl verringert sich die Wirkung von Miconazol]

3] In der gewählten Methode der Atmungs- und Gärungsmessungen.
[Die Intensität der Miconazol-Wirkung auf den Atmungs- und Gärungsstoffwechsel der Zellen ist höher, wenn diese lediglich atmen oder gären und nicht gleichzeitig atmen und gären].

Die Zellatmung wird durch Enzyme gewährleistet, die an die Integrität der inneren Mitochondrienmembran gebunden sind. Wird die innere Mitochondrienmembran geschädigt, so wird dort das Elektronentransportsystem gestört und die Zellatmung reduziert.
Die Reduktion der Zellatmung durch die Gegenwart von Miconazol ist wahrscheinlich auf eine Schädigung der inneren Mitochondrienmembran zurückzuführen. So zeigen de Nollin et al.[57] in elektronenoptischen Bildern nach 24stündiger Einwirkzeit von 5-10 µM Miconazol stark geschwollene und zerrissene Mitochondrien. Eine 13stündige Einwirkzeit von nur 0,1 µM Econazol auf Zellen von T. rubrum führte zu einer morphologischen Umwandlung der länglich geformten Mitochondrien in kugelförmige Gebilde (Preusser[61]). Auch Untersuchungen von Voigt und Plempel[98] und Voigt und Schnell[99] zeigen eine Schädigung der Mitochondrienmembranen bei C. albicans durch Clotrimazol. Weiterhin konnte eine Änderung der Permeabilitätseigenschaften der Mitochondrien-

membran anhand von Efflux-Messungen der Citrat-Synthetase aus Rattenleber Mitochondrien in Gegenwart von Miconazol nachgewiesen werden (Dickinson[107]).

Neuere Ergebnisse von de Nollin et al.[59] lassen vermuten, daß Miconazol mit Enzymen der Elektronentransportkette in Wechselwirkung tritt und damit die Zellatmung hemmt. So zeigen die Autoren, daß die Gegenwart von Miconazol im Kulturmedium eine Hemmung der Cytochrom C-Oxidase und der Peroxidase verursacht.

Die Hemmung der Gärung wird vielfach als Anzeige einer allgemeinen Zellschädigung angesehen, da die Enzyme der Gärung im Cytoplasma vorliegen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß zur 50%igen Hemmung der Gärung eine gleich hohe Konzentration an Miconazol wie zur 50%igen Hemmung der Atmung benötigt wird. Untersuchungen von Kern und Zimmermann[95] dagegen zeigen, daß zur Hemmung der Gärung eine höhere Konzentration an Econazol notwendig ist als zur Hemmung der Atmung. Dieses Ergebnis, ebenso wie die von den Autoren gemessene deutlich erhöhte Sauerstoffaufnahmegeschwindigkeit und Kohlendioxidbildungsgeschwindigkeit der Hefen in Gegenwart niedriger Econazol-Konzentrationen (22,5 μM und 45 μM) konnte beim Einsatz von Miconazol nicht gefunden werden. Lediglich eine sehr gering erhöhte Sauerstoffaufnahmegeschwindigkeit konnte in Gegenwart niedriger Miconazol-Konzentration beobachtet werden. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind wohl, wie schon diskutiert, auf die verschiedenen Untersuchungsbedingungen zurückzuführen.

Seitdem bekannt ist, daß die Gegenwart von Miconazol die Permeabilitätseigenschaften der Plasmamembran für cytoplasmatische Bestandteile ändert (Kap. 4.5), kann angenommen werden, daß die Hemmung der Gärung durch einen Efflux von Metaboliten und Enzymen der Glycolyse verursacht wird.

Als ein weiterer wachstumslimitierender Effekt von Miconazol konnte eine verringerte Aufnahmekapazität als auch eine verminderte initiale

Aufnahmegeschwindigkeit von Glucose, Aminosäuren und Purinen festgestellt werden.

Die Hemmung der Aufnahme verschiedener Metaboliten durch Miconazol ließ vermuten, daß das Fungizid in eine direkte Wechselwirkung mit dem jeweiligen Transportsystem tritt. Auch van den Bossche[55], der in Untersuchungen mit C. albicans eine Hemmung des Purintransports feststellen konnte, vermutete eine spezifische Wechselwirkung von Miconazol mit dem Purintransportsystem.

Die Untersuchung zur spezifischen Wechselwirkung von Miconazol mit dem Purintransportsystem ergab, daß die Gegenwart des Fungizids einen verminderten K_m-Wert und einen verminderten V-Wert verursacht. Als Hemmtyp wurde eine unkompetitive Hemmung festgestellt. Dieser Hemmtyp läßt vermuten, daß Miconazol in einer indirekten Wechselwirkung mit dem Purintransportsystem steht.

Eine indirekte Wechselwirkung von Miconazol mit dem Purintransport läßt sich am ehesten mit einer Änderung des Energiegehaltes der Zellen erklären. So konnte gezeigt werden, daß die Aufnahmekapazität der Zellen an Glucose in Gegenwart von Miconazol vermindert ist. Die Aufnahme und Verwertung von Glucose ist jedoch wichtig für eine Akkumulation von Purinen in der Zelle (Reichert und Winter[67]).

Ein weiterer Einfluß von Miconazol auf den Energiegehalt der Zellen erfolgt indirekt durch die membranotrope Wirksamkeit des Fungizids. Die Präinkubation der Zellen mit Glucose bewirkt den Aufbau eines Protonen- und Kaliumgradienten an der Plasmamembran der Hefen. Dabei ist die Konzentration an Protonen im Medium größer als im Cytoplasma, bei den Kaliumionen verhält es sich umgekehrt. Die Akkumulation von Purinen in der Zelle ist abhängig von diesen beiden Gradienten (Reichert et al.[85,86], Forêt et al.[84]). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen (Kap. 4.5.3), daß selbst geringe Konzentrationen an Miconazol sofort einen Anstieg des externen pH-Wertes verursachen. Der Anstieg des externen pH-Wertes ist mit einem Zusammenbruch des Protonengradienten an der Plasma-

membran zu interpretieren. Messungen von Iwata et al.[100] zeigen, in einem allerdings wesentlich längeren Zeitraum, einen durch Clotrimazol verursachten Efflux an Kaliumionen durch die Zellmembran von C. albicans. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß Miconazol, wie auch andere Imidazol-Antimykotika, in geringen Konzentrationen eine allgemeine Durchlässigkeit der Membran für Ionen bewirkt.
Nach einem Befund von Forêt et al.[84] können die Zellen nach einem Zusammenbruch des H^+- und K^+-Gradienten an der Plasmamembran Purine nicht mehr akkumulieren. Eine Verminderung der beiden Gradienten dagegen würde sowohl zu einer verminderten Aufnahmekapazität als auch zu einer verminderten initialen Aufnahmegeschwindigkeit des Substrats führen. Ein solches Ergebnis wurde für das Purin Adenin gefunden.
Die Miconazol-bedingte verminderte Metabolisierungsgeschwindigkeit von Adenin in verschiedene Purin-Derivate durch die Gegenwart von Miconazol und die spezifische Wechselwirkung von Miconazol mit der Adenin-Desaminase kann zu einer verminderten Akkumulation von Adenin in der Zelle führen (Kap. 4.4.5). Die Hemmung der initialen Purinaufnahme durch Miconazol ist jedoch hauptsächlich auf eine indirekte Wechselwirkung des Fungizids mit dem Transportsystem, über eine Verminderung des Energiegehaltes der Zellen, zurückzuführen.
Das Ergebnis eines indirekten Einflusses von Miconazol auf das Purintransportsystem läßt vermuten, daß das Fungizid in gleicher Weise auch die Aufnahme anderer Metaboliten hemmt. So zeigen Untersuchungen von Eddy et al.[101], Seaston et al.[102] und von Goffeau[103] bei Hefen, daß auch die Aufnahme von Zuckern und Aminosäuren in die Zelle von einem pH- und/oder Ionengradienten an der Plasmamembran abhängig ist.

5.3 Miconazol als membranotropes Agenz

Untersuchungen zur membranotropen Wirkung von Miconazol zeigten, daß das Fungizid sowohl die Stabilität als auch die Permeabilitätseigenschaften der Hefesphaeroplasten-Plasmamembran verändert. So verursachte die Gegenwart von Miconazol sowohl eine Lyse der Sphaeroplasten als auch einen Efflux cytoplasmatischer Bestandteile.
Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen Swamy et al.[18, 56, 96], die einen Efflux von Hämoglobin bei Erythrocyten, einen Efflux an 260 nm absorbierendem Material aus C. albicans und eine Efflux der sauren Phosphatase (und weiterer Enzyme) aus Rattenleber-Lysosomen unter Einfluß von Miconazol feststellen konnten. Eine durch Econazol bedingte Permeabilisierung der Cytoplasmamembran von S. cerevisiae stellten Kern und Zimmermann[95] für 4-Nitrophenyl-2-α-Glucopyranosid fest. Wie schon erwähnt, kamen zu ähnlichen Ergebnissen auch Iwata et al.[100], die unter Clotrimazol-Einwirkung eine Änderung der Permeabilitätseigenschaft der Plasmamembran von C. albicans für K^+-Ionen feststellten.
Sowohl eine Schädigung der Plasmamembran als auch ein Ausfluß cytoplasmatischer Bestandteile ließ sich auch in elektronenoptischen Untersuchungen mit den Imidazol-Antimykotika Miconazol, Econazol und Clotrimazol an den Organismen C. albicans, S. cerevisiae und T. rubrum bestätigen (Preusser[61], Voigt und Plempel[98], Voigt und Schnell[99], de Nollin und Borgers[57, 58]).

Die Intensität des Miconazol-bedingten Effluxes cytoplasmatischer Bestandteile aus Hefesphaeroplasten erwies sich als abhängig von der Inkubationstemperatur. Oberhalb von 18, 5°C stieg die Effluxgeschwindigkeit stärker an als unterhalb dieser Temperatur. Dieses Ergebnis könnte ein Hinweis dafür sein, daß der Zustand der Plasmamembranstruktur einen Einfluß auf die Intensität der Miconazol-Wirkung hat. Die Membranstruktur kann nämlich in zwei Zuständen vorliegen:

Unterhalb von t_T (Phasenumwandlungstemperatur oder Schmelztemperatur der Membran) liegt die Membran im quasi-kristallinen, oberhalb von t_T im quasi-flüssigen Zustand vor. Im quasi-flüssigen Zustand der Membran erfolgt eine laterale und transversale Durchmischung der Phospholipidmoleküle.
Der quasi-flüssige Zustand der Plasmamembran erleichtert vermutlich das Eindringen von Miconazol in die Membranphase. Folglich ist die Wirksamkeit von Miconazol oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur höher als unterhalb. Der Schnittpunkt der beiden Geraden, die den Anstieg der Effluxgeschwindigkeit in Gegenwart von Miconazol in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur darstellen, könnte daher die Phasenumwandlungstemperatur widerspiegeln.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit sehr viel geringeren Miconazol-Konzentrationen und Einwirkzeiten als bisher in der Literatur beschrieben wurde, ein durch Miconazol bedingter Anstieg des externen pH-Wertes festgestellt werden.
Dieser Effekt läßt sich mit einer Permeabilitätsänderung der Plasmamembran für Protonen interpretieren. Der teilweise oder vollkommene Verlust des Protonengradienten an der Plasmamembran bedeutet, wie schon diskutiert, daß die Aufnahme essentieller Metaboliten gehemmt wird. Weiterhin wird das cytoplasmatische Milieu angesäuert, wodurch beispielsweise bestimmte Enzyme inhibiert oder aktiviert werden könnten. So zeigen Untersuchungen von de Nollin et al.[59] eine Aktivierung hydrolytischer Enzyme in Gegenwart von Miconazol. Von der ATPase z.B. ist bekannt, daß sie durch Ansäuerung irreversibel geschädigt wird (Ahlers[82], persönliche Mitteilung).
Im Gegensatz zu vielen anderen membranaktiven Substanzen bewirkt Miconazol eine Änderung der Permeabilitätseigenschaften der Plasmamembran für Ionen und Moleküle unterschiedlicher Größe. Seine Wirkung kann am ehesten mit der der Polyen-Antibiotika verglichen werden. So zeigen Untersuchungen von Swamy et al.[56], daß Miconazol und Polyen-Antibiotika ähnlich stark auf Erythrocyten wirken. Im Gegen-

satz zu den Polyen-Antibiotika ist Miconazol jedoch auch bei Membranen, die keine Sterole enthalten, wirksam.

Da Miconazol die Permeabilitätseigenschaften der Membran ändert, muß es in irgendeine Wechselwirkung mit Membranbestandteilen treten. Es wurde daher untersucht, ob Miconazol einen Einfluß auf die Hauptbestandteile der Hefezellmembran, Proteine und Lipide hat.

Als ein integrales Membranprotein zeigte sich die ATPase empfindlich gegenüber Miconazol. Der Effekt von Miconazol auf die ATPase läßt sich mit einer direkten Wechselwirkung oder mit einer indirekten Wechselwirkung mit der ATPase über Membranlipide, z.B. Phospholipide, erklären. Phospholipide stellen häufig eine Art Matrix für verschiedene Enzyme und Strukturproteine der Membran dar (Cronan und Vagelos[104]). Bindet Miconazol mit Phospholipiden, so wäre eine indirekte Wechselwirkung von Miconazol mit der ATPase denkbar.

Es gilt als mehr wahrscheinlich, daß Miconazol einen indirekten Einfluß auf die ATPase ausübt. So zeigen Untersuchungen von Yamaguchi[105], daß in einem flüssigen Kulturmedium die fungizide Wirkung von Miconazol auf Zellen von C.albicans in Gegenwart von Membranlipiden reduziert ist. Membranproteine dagegen hatten keinen Effekt.

Um den Einfluß von Miconazol auf Membranlipide zu untersuchen, wurde die elektrische Leitfähigkeit von künstlichen Lipidmembranen aus oxidiertem Cholesterol und aus einem Hefelipidextrakt in Gegenwart und in Abwesenheit vonMiconazol untersucht. Die Ergebnisse zeigen, daß beide Membrantypen durch Miconazol eine Leitfähigkeitserhöhung erfahren. Lipide stellen somit ein Angriffsziel für Miconazol dar.

Yamaguchi[105] konnte in einem Agardiffusionstest zeigen, daß besonders die Gegenwart von Phospholipiden einen reduzierenden Effekt auf die Wirkung von Miconazol hatten. Sterole dagegen hatten keinen Einfluß auf die Intensität der Miconazol-Wirkung. Die Miconazol-bedingte Leitfähigkeitserhöhung von Membranen aus oxidiertem Cholesterol steht somit im Gegensatz zu den Ergebnissen von Yamaguchi[105].

Um den Angriffsort von Miconazol an der Membran zu spezifizieren, sollte eine Miconazol-resistente Mutante isoliert werden. Die Versuche zur Induktion und Selektion von Miconazol-resistenten Mutanten verliefen jedoch ergebnislos. Mutanten irgendeiner Spezies mit signifikanter Resistenz gegenüber Miconazol konnten bisher nicht isoliert werden (siehe auch Holt[17]).

5.4 Verminderung der Miconazol-Wirkung durch Kationen

Um einen weiteren Hinweis auf die Wirkung von Miconazol zu bekommen, wurde der zuerst von Swamy et al.[18] beschriebene Effekt, die Reduzierung der Miconazol-Wirkung durch divalente Kationen, näher untersucht.

Swamy et al.[18] zeigen, daß Miconazol das Wachstum der Zellen in synthetischem Medium und in Sabouraud-Medium unterschiedlich hemmt. Die Autoren interpretieren diesen Effekt mit einer Hemmung der Miconazol-Wirkung durch divalente Kationen, die in den beiden Medien vermutlich in unterschiedlicher Konzentration vorliegen. Wie in dieser Arbeit festgestellt werden konnte, ist die höhere Wirksamkeit von Miconazol im Sabouraud-Medium hauptsächlich auf den (im Vergleich zum synthetischen Medium) höheren pH-Wert des Mediums zurückzuführen. Aufnahmeuntersuchungen mit Miconazol hatten nämlich ergeben, daß mit Zunahme des pH-Wertes die initiale Aufnahmegeschwindigkeit für Miconazol steigt. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Aufnahme von Miconazol nicht nur in Gegenwart von divalenten Kationen, sondern auch in Gegenwart von mono- und trivalenten Kationen vermindert ist. Mit steigender Wertigkeit der Kationen wurde eine zunehmende Verringerung der Miconazolaufnahme festgestellt. Folgerichtig zur verminderten Miconazol-Aufnahme in Gegenwart von

Kationen konnte auch eine verminderte Miconazol-Wirkung festgestellt werden. Da nach einer Präinkubation der Zellen mit Miconazol die Kationen einen nicht so starken Effekt auf die Miconazol-Wirkung hatten, war zu vermuten, daß Miconazol mit den Kationen in eine direkte Wechselwirkung tritt. Hierzu konnte eine Komplexbildung von Miconazol mit Aluminiumnitrat gemessen werden. Es zeigte sich,daß drei oder vier Aluminium-Ionen ein Miconazol-Molekül binden. Da der durch 100 μM Miconazol induzierte Ionenfluß an der Plasmamembran durch 30-40 μM Miconazol aufzuheben war, kann davon ausgegangen werden, daß drei Aluminium-Ionen mit einem Miconazol-Molekül komplexieren.

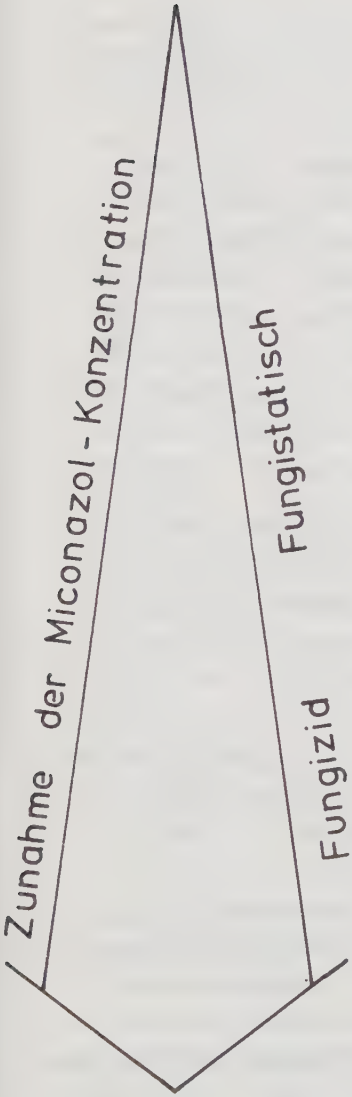
Eine Komplexbildung von mono- und divalenten Kationen wurde nicht gemessen. Eine Ausfällung von divalenten Kationen mit Miconazol konnte jedoch beobachtet werden. Da sowohl mono- als auch divalente Kationen die Aufnahme von Miconazol in die Zelle reduzieren (Kap. 4.6.2), kann angenommen werden, daß auch diese Kationen mit Miconazol Komplexe eingehen.

6. HYPOTHESE ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS VON MICONAZOL

Aus der vorangegangenen Diskussion läßt sich folgende Hypothese zum Wirkungsmechanismus von Miconazol ableiten:
Miconazol wird in der deprotonierten Form und entsprechend seinem Verteilungskoeffizienten (zwischen wässriger Phase des Inkubations puffers und der Lipidphase der Membran) von der Zelle aufgenommen. In der Membranphase tritt es in hydrophobe Wechselwirkung mit den Lipiden. Für die fungizide Wirksamkeit von Miconazol wird die sterische Konformation des Moleküls verantwortlich sein. So zeigen Untersuchungen mit anderen Imidazol-Antimykotika, wie zum Beispiel mit Clotrimazol (Büchel et al.[106]), daß die sterische Konformation des Moleküls wichtiger ist für die biologische Wirksamkeit als die Lipophile.
Die fungizide Wirkung von Miconazol beruht auf einer unspezifischen Änderung der Permeabilitätseigenschaften der Plasmamembran sowie aller cytoplasmatischen Membransysteme für Ionen und Metaboliten. Fungistatische Miconazol-Konzentrationen haben einen Einfluß auf die Ionengradienten an der Plasmamembran und an den cytoplasmatischen Membranen. An der Mitochondrienmembran wird der Protonengradient aufgehoben und so die oxidative Phosphorylierung entkoppelt. Entsprechend der chemiosmotischen Theorie von Mitchell wird die Bildung von ATP inhibiert.
Die Atmung der Zellen ist gehemmt und der petite-Phänotyp der Zellkolonien ist zu beobachten (Kap. 4.1). Die Verminderung des Protonen- und Kaliumgradienten an der Plasmamembran bewirkt eine Hemmung der Aufnahme wesentlicher Metaboliten. Im flüssigen Kulturmedium ist daher eine verminderte exponentielle Wachstumsgeschwindigkeit zu beobachten (Kap. 4.1). Höhere Miconazol-Konzentrationen bewirken eine Aufhebung der Ionengradienten an der Cytoplasmamembran. Dadurch wird die Aufnahme und Akkumulation von Metaboliten total gehemmt. Weiterhin wird die Membran permeabel für Metaboliten mit

geringem Molekulargewicht. Fungizide Miconazol-Konzentrationen bewirken schließlich eine Zerstörung der Membranstruktur und damit einen Ausfluß cytoplasmatischen Materials wie Proteine und Lipide.

In Tabelle 7 ist der Wirkungsmechanismus von Miconazol zusammenfassend dargestellt.



Die Cytoplasmamembran und die Mitochondrienmembran wird permeabel für Protonen und Kaliumionen. An der Mitochondrienmembran erfolgt eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung. An der Plasmamembran halten zunächst die Protonenpumpe und die Kaliumpumpe noch die Gradienten aufrecht, so daß die Transportgeschwindigkeit wesentlicher Metaboliten nur vermindert wird. Die exponentielle Wachstumsgeschwindigkeit und der stationäre Zelltiter sind reduziert.

Der Protonen- und Kaliumgradient an der Plasmamembran bricht zusammen. Durch Ansäuerung des cytoplasmatischen Milieus werden bestimmte Enzyme inhibiert, andere aktiviert.

Die Zellmembran wird permeabel für cytoplasmatische Bestandteile (Proteine, Lipide, ATP, NAD usw.). Hydrolytische Enzyme werden freigesetzt. Alle Membransysteme der Zelle sind vollkommen zerstört.

Tabelle 7:

Wirkungsmechanismus von Miconazol

7. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden Untersuchungen zum Mechanismus der antimykotischen Wirkung von Miconazol, einem Imidazol-Derivat an der Hefe Saccharomyces cerevisiae durchgeführt.

Die Koloniebildungsfähigkeit der Zellen in Gegenwart von Miconazol zeigte eine biphasige Dosis-Effekt-Kurve. Unterhalb fungistatischer Miconazol-Konzentrationen waren die Zellkolonien phänotypisch verändert. Oberhalb fungistatischer Miconazol-Konzentrationen nahm die Koloniebildungsfähigkeit der Zellen mit zunehmender Konzentration rasch ab. Im flüssigen Kulturmedium bewirkte Miconazol eine verminderte exponentielle Wachstumsgeschwindigkeit, einen verringerten stationären Zelltiter und eine Verlängerung der lag-Phase, wobei die Ausprägung der Effekte von der Miconazol-Konzentration abhängig war.

Die Aufnahmegeschwindigkeit von Miconazol in die Zellen erwies sich als abhängig von dem Verhältnis der Miconazol-Konzentration zu der Zelldichte und von dem pH-Wert des Aufnahmepuffers. Der Anteil der Miconazol-Moleküle, die von den Zellen aufgenommen wurden, stieg mit zunehmendem pH-Wert. Die Aufnahme von Miconazol in die Zellen erwies sich als reversibel.

Miconazol hatte einen Einfluß auf den Atmungs- und Gärungsstoffwechsel der Zellen. So wurde sowohl die Sauerstoffaufnahmegeschwindigkeit als auch die Kohlendioxidbildungsgeschwindigkeit der Zellen mit zunehmender Fungizid-Konzentration vermindert.

Die initiale Aufnahmegeschwindigkeit und die Aufnahmekapazität der Zellen für wesentliche Metaboliten (Glucose, Aminosäuren und Purine) wurde mit steigender Miconazol-Konzentration zunehmend gehemmt. Messungen zur Bestimmung der spezifischen Wechselwirkung von Miconazol mit dem Purintransportsystem ergaben in Gegenwart des Fungizids eine Verminderung der kinetischen Konstanten K_m und V. Die Hemmung wurde als unkompetitiv charakterisiert.

Die Verminderung der Stabilität von Sphaeroplasten in Gegenwart von Miconazol erwies sich als abhängig von dem Verhältnis der Miconazol-

Konzentration zu der Zelldichte. Weiterhin bewirkte Miconazol eine Veränderung der Permeabilitätseigenschaften der Sphaeroplastenmembran für cytoplasmatische Bestandteile. Bei intakten Zellen bewirkte Miconazol einen Ausfluß aufgenommener Metaboliten und schon bei sehr geringen Konzentrationen und kurzen Einwirkzeiten eine Verminderung des H^+ bzw. OH^--Gradienten an der Plasmamembran.

Um den Bindungsort von Miconazol an der Plasmamembran zu identifizieren wurde untersucht, ob Miconazol mit den Hauptbestandteilen der Membran, den Proteinen und Lipiden, in Wechselwirkung tritt. Hierbei zeigte sich die ATPase, die als ein integrales Membranprotein gilt, als empfindlich gegenüber Miconazol. Künstlich hergestellte Membranen aus oxidiertem Cholesterol und aus einem isolierten Hefelipidextrakt erfuhren eine Verminderung ihres elektrischen Widerstandes in Gegenwart von Miconazol. Miconazol-resistente Mutanten, die einen Hinweis auf den Bindungsort von Miconazol an der Membran geben sollten, konnten nicht isoliert werden.
Um einen weiteren Hinweis auf den Wirkungsmechanismus von Miconazol zu bekommen, wurde der " Kationen-Effekt " näher untersucht. Mono-, di- und trivalente Kationen verringerten, mit steigender Wertigkeit zunehmend, die Aufnahme von Miconazol in die Zelle.
Die Wirkung von Miconazol war folglich reduziert. Als Ursache der verminderten Miconazol-Aufnahme wurde eine Ausfällung des Fungizids mit di- und trivalenten Kationen beobachtet. Eine Komplexbildung von Miconazol mit Aluminiumnitrat wurde röntgenographisch nachgewiesen. Die Auswaage des Glührückstandes des Komplexes zeigte, daß ein Aluminium-Ion mit drei bis vier Miconazol-Molekülen komplexiert.

Die Aufnahme von Miconazol in die Zelle erfolgt wahrscheinlich in der deprotonierten Form und entsprechend dem Verteilungskoeffizienten von Miconazol zwischen wässriger und lipoider Phase. Als primäre Wirkungsweise von Miconazol wird eine Änderung der Permeabilitäts-

eigenschaften aller Membransysteme angenommen. An der inneren Mitochondrienmembran wird der Protonengradient beseitigt und somit die oxidative Phosphorylierung entkoppelt. Die Folge ist ein verminderter stationärer Zelltiter. An der Plasmamembran bewirkt die Beseitigung des Protonengradienten und wahrscheinlich auch des Kaliumgradienten eine Hemmung der Aufnahme wesentlicher Metaboliten. Fungizide Konzentrationen an Miconazol bewirken einen Efflux cytoplasmatischer Bestandteile.

8. LITERATUR

1] Nicolle, Ch. (1934). "Destin des Maladies Infectieuses" Alcan, Paris

2] Dubos, R. (1958). Zitiert nach Grumbach, A. (1969). "Werden, Sein und Vergehen der Infektionskrankheiten" In "Die Infektionskrankheiten des Menschen und ihre Erreger" (Grumbach, A. und Kikuth, W., ed.) Georg Thieme Verlag, Stuttgart

3] Burnet, F.M. (1962). "Natural History of Infectious Disease" Cambridge University Press, London

4] Doerr, R. (1941). Zitiert nach Grumbach, A. (1969). "Werden, Sein und Vergehen der Infektionskrankheiten" In "Die Infektionskrankheiten des Menschen und ihre Erreger" (Grumbach, A. und Kikuth, W., ed.) Georg Thieme Verlag, Stuttgart

5] Vandaele, R. und Uttendaele, K. (1972). Arzneim. Forsch. 22, 1221-1223

6] Gemeinhardt, R. (1976). "Endomycosen des Menschen", p. 136 Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

7] Bach, H.C. (1965). "Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe", pp. 317-325, Urban und Schwarzenberg Verlag, München

8] Loskant, G. (1967). Zitiert nach Rindt, W. und Weigerding, A. (1977). Med. Klin. 72, 598-600

9] Hurley, R. (1977). Proc. roy. Soc. Med. 70, Supplement 4, 1-2

10] Polemann, G. (1970). Zitiert nach Gemeinhardt, R. (1976) "Endomycosen des Menschen", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

11] Godefroi, E.F., Heeres, J., Van Cutsem, J. und Janssen, P.A.J. (1969). J. med. Chem. 12, 784-791

12] Shadomy, S., Paxton, L., Espinel-Ingroff, A. und Shadomy, H.J. (1977). J. of Antimicrob. Chemother. 3, 147-152

13] Van Cutsem, J. M. und Thienpont, D. (1972). Chemotherapy 17, 392-404

14] Brugmans, J. P., Van Cutsem, J, M. und Thienpont, D. (1970). Arch. Derm. 102, 428-432

15] Botter, A. A. (1971). Mycosen 14, 187-191

16] Godts, P., Vermylen und Van Cutsem, J. M. (1971). Arzneim. Forsch. 21, 256-257

17] Holt, R. J. (1974). Infection 2, 95-107

18] Swamy, K. H. S., Sirsi, M. und Rao, G. R. (1974). Antimicrobiol. Agents Chemother. 5, 420-425

19] Holt, J. R. (1973). 8th International Congress of Chemotherapy, Athens

20] Sawyer, P. R., Brogden, R. N., Pinder, R. M., Speight, T. M. und Avery, G. S. (1975). Drugs 9, 406-423

21] Gentles, J. C., Jones, G. R. und Roberts, D. T. (1975). Br. J. Derm. 93, 79-84

22] Mandy, S. J. und Garrot, T. C. (1974). J. Am. med. Ass. 230, 72-75

23] Vanheule, R., Adriaensen, K., De Hauwere, R., Van Cutsem, J. M., De Cree, J. (1974). Castellania 2, 91-92

24] Botter, A. A. (1972). Mycosen 15, 179-183

25] Guimarães, N., Pereira, C. G. C. und Macêdo, M. J. O. (1973). A Fohla Medica 66, 303-308

26] Thulin, H. und Østerbye (1975). Mycosen 18, 249-253

27] Swejgaard, E., (1973). Dermato-Venerologica 53, 497-5oo

28] Manohar, V., Ramananda Rao, G., Sirsi, M. und Krishnamurti, N. (1976). Mycopathologia 59, 57-60

29] Mertens, R. L. J., Morias, J. und Verhamme (1976) Dermatologica 153, 228-235

30] Fishman, O. und Camargo, Z. P. (1974). Mycosen 17, 251-255

31] Fulton, J. E. (1975). Arch. Derm. 111, 596-598

32] Gatti, F., Rossetti, C., Mazebo, S. und Lontie, M. (1974). Afr. Med. 13, 785-791

33] Rutgeerts, L. und Verhaegen, H. (1977). Gastroenterology 72, 316-318

34] Tytgat, G.N., Surachno, S., DeGroot, W.P. und Schellekens, P.T. (1977). Gastroenterology 72, 536-540

35] Hoeprich, P.D. und Goldstein, E. (1974). J.A.M.A. 230, 1153-1157

36] Stevens, D.A., Levine, H.B., Stanley, C.D. (1976) Am.J.Med. 60, 191-202

37] Proost, J.M., Maes-Dockx, F.M., Nelis, M.O. und Van Cutsem, J.M. (1972). Am.J.Obstet Gynecol. 112, 688-692

38] Eloy, R. (1972). Proceedings of the XXIVe Congrès de la Fédération des Sociétés de Gynécologie et d'Obstétrique de langue Française. Tunis, September 12-15, 1972. Paris, Masson et Cie, 1972, pp 372-374

39] Thiery, M., Mrozowski, B.J. und Van Kets, H. (1972). Mycosen 15, 35-37

40] Schenk, D., Ruttgers, H. und Kubli (1974). Med. Klinik 69, 1541-1542

41] Davis, J.E., Frudenfeld, J.H. und Goddard, J.L. (1974). Obstet. Gynecol. 44, 403-406

42] Culbertson, C. (1974). Am.J.Obstet. Gynecol. 120, 973-976

43] Peeters, F., Snauwaert, R., Segers, J., Van Cutsem, J.M. und Amery, W. (1973). Arzneim. Forsch. 23, 1107-1111

44] Godts, P., Vermylen, P., Van Cutsem, J.M. (1971). Arzneim. Forsch. 21, 256-257

45] Alexander, J., Cornelissen, J., Debrabandere, L., Timmermans, H.L., Vandeputte, E., Van Waes. A. und Van Waes-Van de Velde, E. (1972). Eur.J.Obstet. Gynecol. 2, 65-70

46] Korte, M. (1973). Castellania 1, 19

47] Lurie, D. (1972). Schweiz. Rundschau f. Med. 61, 1365-1370

48] Pasquale, S.A., Yuliano, S.E., Lawson, J., McLeod, M., und McNellis, D. (1977). Contraception 15, 355-361

49] Rutherford, A.M. (1976). N.Z. med.J. 84, 9-10

50] Balmer, J.A. (1976). Am.J.Obstet. Gynecol. 126, 436-442

51] Wallenburg, H.C.S. und Wladimiroff, J.W. (1976). Obstet. Gynecol. 48, 491-494

52] Katz, M.E. und Cassileth, P.A. (1977). J.A.M.A. 237, 1124-1125

53] Deresinski, S.C., Lilly, R.B., Levine, H.B., Galgiani, J.N. und Stevens, D.A. (1977). Arch. Intern. Med. 137, 1180-1185

54] Svejgard, E. (1976). Acta dermato. Venerologica 56, 303-3o6

55] Van den Bossche, H. (1974). Biochem. Pharmacol. 23, 887-899

56] Swamy, K.H.S., Sirsi, M. und Rao, G.R. (1976). Biochem. Pharmacol. 25, 1145-1150

57] De Nollin, S. und Borgers, M. (1974). Sabouraudia 12, 341-351

58] De Nollin, S. und Borgers, M. (1975). Antimicrobiol. Agents Chemother. 7, 704-711

59] De Nollin, S., Van Belle, H., Goossens, F., Thone, F. und Borgers, M. (1977). Antimicrobiol. Agents Chemother 11, 500-513

60] Schär, G., Kayser, F.H. und Dupont, M.C. (1976). Chemotherapy 22, 211-220

61] Preusser, H.-J. (1975). Mycosen 18, 453-465

62] Thienpont, D., Van Cutsem, J., Van Nueten, J.M., Niemegers, J.E und Marsboom, R. (1975). Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 25, 224-230

63] Zimmermann, F.K. (1975). VI. Congr. Internat. Soc. Human and Animal Mycol., Tokyo, Japan

64] Polak, A. und Grenson, M. (1973). Eur. J. Biochem. 32, 276-282

65] Reichert, U. (1968). Doktorarbeit, FU Berlin

66] Umbreit, W.W., Burris, R.H. und Stauffer, J.F. (1957). "Manometric Techniques", Burgess, Minneapolis

67] Reichert, U. und Winter, M. (1974). Biochim. Biophys. Acta 356, 108-116

68] Seipel, S. und Reichert, U. (1975). Protoplasma 84, 127-135

69] Ahlers, J. (1974). Biochem. J. 141, 257-263

70] Ahlers, J., Kabisch, D. und Günther, Th. (1975). Can. J. Biochem. 53, 658-665

71] Ahlers, J. (1972). Doktorarbeit, Universität Mainz

72] Schaffner, W. und Weissmann, C. (1973). Anal. Biochem. 56, 502-514

73] Folch, J. M. L. und Slone Stanley, G H. J (1957).
J. Biol. Chem. 226, 497-509

74] Ansell, G. B. und Spanner, S. (1971). "Methods of Neurochemistry"
M. Dekker Incorp., New York

75] Jain, M. K. (1972). "The Bimolekular Lipid Membrane:A System".
Van Norstrand Reinhold Company, New York

76] Grupe, R. (1976). In:wissenschaft und fortschritt 26, 444-450

77] Mueller, P., Rudin, D. O., Thien, H. T., und Wescott, W. C. (1962).
Nature 194, 979-981

78] Schulz-Harder, J. und Lüschow, U. (1977). Hoppe Seylers
Z. Physiol. Chem. 358, 304

79] Lüschow, U. und Schulz-Harder, J. (1977). Hoppe Seylers
Z. Physiol. Chem. 358, 272

80] Lüschow, U., Heckmann, K. D. und Pring, M. (1975).
Biochim. Biophys. Acta 389, 1-12

81] Lossen, O. (1977). Universität Regensburg, unveröffentlicht ,

82] Ahlers, J. (1977). Freie Universität Berlin, unveröffentlicht

83] Seipel, S. und Reichert, U. (1977). J. Chromatogr. 135, 485-488

84] Forêt, M., Schmidt, R. und Reichert, U. (1978). Eur. J. Biochem. 82, 33-43

85] Reichert, U., Schmidt, R. und Forêt, M. (1975). FEBS Lett. 52, 100-102

86] Reichert, U. und Forêt, M. (1977). FEBS Lett. 83, 325-328

87] Fuhrmann, G. F., Wehrli, E. und Boehm, C. (1974).
Biochim. Biophys. Acta 363, 295-310

88] Riemersma, J. C. und Alsbach, E. J. J. (1974).
Biochim. Biophys. Acta 339, 274-284

89] Schibeci, A., Rattray, J. B. M. und Kidby, D. K. (1973).
Biochim. Biophys. Acta 311, 15-25

90] Foury, F. und Goffeau, A. (1975). J. Biol. Chem. 250, 2354-2362

91] Mitchell, P. (1973). Bioenergetics 4, 63-91

92] Hunter, K. und Rose, A. H. (1971). "Yeast lipids and membranes",
pp. 211-270. In: "The Yeasts" (Rose, A. H. und Harrison,
J. S., ed.), vol. 2., Academic Press Inc., London

93] Andreasen und Stier (1953). Zitiert nach Keith, A.D., Wisnieski, B.J.H. und Williams, J.C. (1973), "Membranes of Yeast and Neurospora: Lipid Mutants and Physical Studies", pp. 259-321. In Erwin, J.A. (ed.), "Lipids and Biomembranes of Eukaryotic Microorganisms", Academic Press, New York and London

94] Rothmann, J.E. und Engelmann, D.M. (1972). Nature, New. Biol. 237, 42-44

95] Kern, R. und Zimmermann, F.K. (1977). Mycosen 20, 133-146

96] Swamy, K.H.S., Joshi, A. und Rao, G.R. (1976). Antimicrob. Agents Chemother, 9, 903-907

97] Raab, W. und Gmeiner, B. (1976). Mycosen 19, 238-240

98] Voigt, W.H. und Plempel, M. (1974). Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 24, 508-515

99] Voigt, W.H. und Schnell, J.D. (1974). Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 24, 516-521

100] Iwata, K., Yamaguchi, H. und Hiratani, T. (1973). Sabouraudia 11, 158-166

101] Eddy, A.A. und Nowacki, J.A. (1971). Biochem. J. 122, 701-711

102] Seaston, A., Inkson, C. und Eddy, A.A. (1973). Biochem. J. 134, 1031-1043

103] Goffeau, A. (1975), "Physiology and Biochemistry of Respiration in Schizosaccharomyces pombe". In: "Membrane biogenesis" (Tzagoloff, A., ed.), Plenum Press, New York, London

104] Cronan, J.E. und Vagelos, P.R. (1972). Biochim. Biophys. Acta 265, 25-60

105] Yamaguchi, H. (1977). Antimicrob. Agents Chemother. 12, 16-25

106] Büchel, K.H., Draber, W., Regel, E. und Plempel, M. (1972). Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 22, 1260-1272

107] Dickinson, D.P. (1976). Biochem. Pharmac. 26, 541-542

Für das Thema der vorliegenden Arbeit sowie für hilfreiche Diskussionen möchte ich Herrn Priv.Doz. Dr. Uwe Reichert vielmals danken.

Frl. Gisela Windisch und Herrn Dr. J. Schulz-Harder (Universität Regensburg) bin ich für die Einweisung in die Herstellung künstlicher Lipidmembranen zu Dank verpflichtet.

Herr Prof. Dr. R. Frydrych half mir dankenswerterweise mit einer röntgenographischen Messung.

Allen Mitarbeitern des Hauses Ehrenbergstraße, insbesondere den Mitgliedern der Arbeitsgruppe " Biomembranen ", möchte ich für Unterstützung und für die freundliche Arbeitsatmosphäre danken.

Lebenslauf

Name:	Rainold Uwe Gustav Karl ARNDT
Eltern:	Dr. Hans Arndt Elisabeth Arndt, geb. Walterscheid
21.5.1949:	geboren in Berlin-Zehlendorf
April 1955:	Einschulung in die 12. Grundschule Berlin-Steglitz
April 1962:	Übergang in die Kopernikus-Schule (Realschule)
März 1966:	Schulabschluß mit dem Zeugnis der Mittleren Reife Wechsel zur Privaten Kant-Schule-Berlin für 18 Monate
Februar 1968:	Berufstätigkeit bis Sommer 1970
August 1968:	Aufnahme in die Peter-A. Silbermann-Schule (Berliner Abendgymnasium f. Berufstätige)
Oktober 1969:	Erstimmatrikulation an der Freien Universität Berlin (kleine Matrikel) für das Fach Biologie
Mai 1970:	Ablegung der Reifeprüfung an der Peter-A. -Silber- mann Schule
Oktober 1971:	Vordiplomprüfung an der Freien Universität im Fach Biologie
November 1974:	Abschluß des Studiums als Diplom-Biologe
April 1975:	Beginn der Dissertation

Bönecke-Druck 3392-Clausthal-Z. 29